

# **Tratamento por 15 dias com Tributilestanho Diminui a Reatividade Vascular em Anéis Isolados de Aorta de Ratas**

**Samya Mere Lima Rodrigues**

**Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas  
(Fisiologia Cardiovascular)**

**Mestrado em Ciências Fisiológicas  
(Fisiologia Cardiovascular)**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas**  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Vitória, Maio de 2014.



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Universidade Federal do Espírito Santo**  
***Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas***

**Parecer Final da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado**

A mestranda **Samya Mere Lima Rodrigues**, sob orientação da Profa. Dra. Ivanita Stefanon e co-orientação do Prof. Dr. Jones Bernardes Graceli, encaminhou a dissertação de mestrado intitulada **“Tratamento por 15 dias com Tributilestanho Diminui a Reatividade Vascular em Anéis Isolados de Aorta de Ratas”** à Comissão Julgadora composta pela examinadora externa Profa. Dra. Adriane Belló Klein - UFRGS e a examinadora interna Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nazaré Souza Bissolli – UFES. A Dissertação de Mestrado foi cuidadosamente analisada e cada avaliador emitiu um parecer sobre o trabalho executado pela candidata. A candidata, com a concordância de sua orientadora, acatou todas as alterações propostas pelos avaliadores, reapresentando uma nova versão da Dissertação de Mestrado.

Diante do exposto acima, a Comissão Julgadora considera a candidata aprovada e, portanto, fazendo jus à obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Vitória – ES, 23 de Maio de 2014.

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nazaré Souza Bissolli**

Presidente da Comissão Julgadora - Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. IVANITA STEFANON**

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Fisiológicas



Av. Marechal Campos, 1468 – Maruípe  
Vitória – ES CEP: 29.042-755  
Tel.: 0XX(27) 3335-7340 Fax: 3335-7330  
<http://www.ppgcf.ufes.br> e-mail:  
[secretaria@ppgcf.ufes.br](mailto:secretaria@ppgcf.ufes.br)



# **Tratamento por 15 dias com Tributilestanho Diminui a Reatividade Vascular em Anéis Isolados de Aorta de Ratas**

Samya Mere Lima Rodrigues

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Cardiovascular.

Aprovada em 26/05/2014 por:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivanita Stefanon – Orientadora, UFES

---

Prof. Dr. Jones Bernardes Graceli – Co-Orientador, UFES

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Adriane Belló Klein – UFRGS

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nazaré Souza Bissoli – UFES

---

Coordenadora do PPGCF Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivanita Stefanon

Rodrigues, Samya Mere Lima 1976

Tratamento por 15 dias com tributilestanho diminui a reatividade vascular em anéis isolados de aorta de ratas [Vitória] 2014  
85p., 29,7cm (UFES, M. SC., Ciências Fisiológicas, 2014)

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivanita Stefanon

Co-Orientador: Prof Dr. Jones Bernardes Graceli

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.

1. Tributilestanho 2. Reatividade Vascular 3. Estrogênio 4. Músculo Liso Vascular

Á Deus  
Ao meu filho Daniel  
Á minha família

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por sempre me dar muito mais do que necessito, atendendo minhas orações e protegendo todos os que amo.

À pesquisa experimental que através de suas incursões árduas faz descobertas que modificam a vida dos seres humanos.

Ao meu filho Daniel que é minha fonte de inspiração com todas as suas interrogações que são folego de vida e me incentivam a aprender mais.

À minha mãe Maria de Fátima, meu pai José Rodrigues e minha irmã Sony Mára, pelo constante sacrifício de tentar manter o equilíbrio econômico, social e psicológico que me faltaram em diversos momentos. Tenho muito orgulho de ter uma família amorosa e unida.

À minha prima Eliane Gomes Rodrigues sempre disposta a ajudar, pelo apoio emocional, compreensão e carinho.

Aos professores da graduação Thiago de Melo Costa Pereira, Ivy Alcoforado Felisberto, Livia Carla de Melo Rodrigues, Rosimar Margarete Alvarenga e Margarete Rose Sampaio Fortes que despertaram em mim um desejo de ser como eles, buscando sempre um conhecimento conquistado por muitas noites de estudos.

Aos professores Ivanita Stefanon e Dalton Valentim Vassallo a quem tenho uma admiração e carinho muito especial, que no dia-a-dia demonstram paciência, compreensão e uma humildade difícil de ser encontrada nos dias atuais, incluo vocês e seus familiares em todas as minhas orações.

Ao professor Jones Bernardes Graceli, cuja linha de pesquisa originou meu trabalho de conclusão de curso e dissertação de mestrado, e pela liberdade que me foi dada por ele para sugerir modificações onde sua co-orientação me direcionou para diversas perspectivas.

Aos demais colaboradores pelo empenho e dedicação que renderam resultados muito proveitosos e corroborativos com nossa experimentação funcional.

À fisioterapeuta e doutoranda Priscila Rossi de Batista que foi imprescindível em muitos momentos da minha vida inicial de pesquisadora, pois seu zelo e sabedoria me fazem admirá-la cada dia mais, você é um ser humano lindo.

Ao ensino federal que me proporcionou conhecer e fazer parte da pesquisa experimental e a todos os colegas do LEMC, pelas críticas construtivas e incentivo.

Agradeço também as agências de fomento CAPES, FAPES e CNPq pelo financiamento do projeto e concessão de bolsa de estudos.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>27</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	28
3.1.1 Grupos experimentais.....	28
3.1.1.1 Determinação das fases do ciclo estral.....	28
3.1.2.1 Avaliação hormonal.....	29
3.2 PREPARAÇÃO DOS TECIDOS.....	30
3.2.1 Histomorfometria da parede dos anéis de aorta.....	30
3.2.2 Densidade superficial de colágeno.....	30
3.3 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E IMUNOBLOTTING.....	31
3.3.1 Preparação do tecido e quantificação das proteínas.....	31
3.3.2 Western Blot para detecção de alfa actina de músculo liso ( $\alpha$ -AML).....	31
3.4 QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DO ÂNION SUPERÓXIDO .....	32
3.5 OBTENÇÃO DOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA.....	33
3.5.1 Preparação dos anéis de aorta.....	33
3.5.2 Obtenção de registros de tensão.....	34
3.5.3 Avaliação da reatividade vascular ao cloreto de potássio (KCl).....	35
3.5.4 Avaliação da integridade funcional do endotélio.....	36
3.6 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	37
3.6.1 Efeito do tratamento por 15 dias com TBT sobre a resposta vasoconstritora a fenilefrina.....	37
3.6.2 Efeito do tratamento por 15 dias com tributiestanho sobre a	



modulação do endotélio na resposta vasoconstritora a fenilefrina.....	37
3.6.3 Estudo dos fatores endoteliais envolvidos no tratamento por 15 dias com tributilestanho sobre a resposta a fenilefrina na aorta.....	37
3.6.4 Influência do tratamento por quinze dias com tributilestanho na via do óxido nítrico.....	38
3.6.5 Influência do tratamento por 15 dias com tributilestanho sobre os canais para $K^+$ .....	38
3.6.6 Envolvimento de radicais livres no tratamento por 15 dias com tributilestanho sobre a resposta contrátil a fenilefrina.....	38
3.6.7 Efeito do tratamento por 15 dias com tributilestanho na resposta ao relaxamento dependente do endotélio.....	38
3.6.8 Efeito do tratamento por 15 dias com tributilestanho na resposta ao relaxamento independente do endotélio.....	39
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
3.8 DROGAS E SOLUÇÕES UTILIZADAS.....	39
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>66</b>
<b>Anexo.....</b>	<b>74</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Algumas medidas legislativas sobre o uso do TBT.....	22
<b>Tabela 2.</b> Concentrações plasmáticas de hormônios sexuais femininos, ingestão de alimentos, peso corporal e cardíaco de ratas Wistar CONT e TBT. Valores apresentados como a média $\pm$ EPM. Teste <i>t</i> Student não pareado. * $p < 0,05$ . .....	41
<b>Tabela 3.</b> Valores de $pD_2$ e resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ) obtidos por curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de animais não tratados (CON) e tratados (TBT).....	48
<b>Tabela 4.</b> Valores de $pD_2$ , resposta máxima e área abaixo da curva obtidos através de curva concentração resposta à fenilefrina em anéis de aorta torácica de ratas sem endotélio controle ( <b>CON</b> ) e tratadas ( <b>TBT</b> ).....	50
<b>Tabela 5.</b> Valores de $pD_2$ , resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ) e área sob a curva (dAUC) obtidos por curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de animais não tratados ( <b>CONT</b> ) e tratados ( <b>TBT</b> ) incubados com L-NAME.....	52
<b>Tabela 6.</b> Valores de $pD_2$ , resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ) e área sob a curva (dAUC) obtidos por curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de animais não tratados ( <b>CONT</b> ) e tratados ( <b>TBT</b> ) incubados com TEA.....	54
<b>Tabela 7.</b> Valores de $pD_2$ , resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ) e área sob a curva (dAUC) obtidos por curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de animais não tratados ( <b>CONT</b> ) e tratados ( <b>TBT</b> ) incubados com Apocinina.....	56
<b>Tabela 8.</b> Valores de $pD_2$ , e da resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ) obtidos por curva concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio em anéis de aorta de animais não tratados ( <b>CONT</b> ) e tratados ( <b>TBT</b> ).....	58
<b>Tabela 9.</b> Valores de $pD_2$ , e da resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ) obtidos por curva concentração-resposta acetilcolina em anéis de aorta de animais não tratados ( <b>CONT</b> ) e tratados ( <b>TBT</b> ).....	59

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Aorta torácica imersa em placa de Petri contendo solução de Krebs, após a remoção do tecido conjuntivo adjacente à artéria e sendo dividida em segmentos cilíndricos entre 3-4 mm.....	34
<b>Figura 2:</b> Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular “ <i>in vitro</i> ”. Sistema de aquisição de dados Biopac Systems.....	35
<b>Figura 3:</b> Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio.....	36
<b>Figura 4:</b> Esquema demonstrativo dos protocolos experimentais. Incubação com o fármaco a ser estudado e depois de trinta minutos realizou-se a curva concentração-resposta à FE.....	38
<b>Figura 5:</b> Fotomicrografias de anéis de aorta coradas com HE de ratas Wistar <b>CONT</b> e <b>TBT</b> . (A) anel da aorta <b>CONT</b> mostrando lâminas elásticas e células endoteliais com morfologia normal. (B) anel de ratas tratadas com <b>TBT</b> mostrando sinais de atrofia vascular. (C) Representação gráfica da espessura da parede da aorta em ambos os grupos experimentais (média ± EPM). * $p < 0,05$ vs CONT. Bar = 20µm.....	43
<b>Figura 6:</b> Avaliação da densidade superficial de colágeno de anéis de aorta realizada por coloração tricrômio de Mallory. (A) Imagem representativa do anel aórtico <b>CONT</b> . (B) Imagem representativa do anel aórtico tratado com <b>TBT</b> . (C) Representação gráfica do aumento densidade superficial colágeno na parede da aorta dos animais tratados com <b>TBT</b> média ± EPM). * $p < 0,05$ vs CONT. Bar=20µm.....	45
<b>Figura 7:</b> Detecção <i>in situ</i> de ânion superóxido. Micrografias de fluorescência de anéis de aorta corados com DHE O <sub>2</sub> -sensível (fluorescência vermelha) foram obtidos a partir dos grupos <b>CONT</b> e <b>TBT</b> . As imagens foram adquiridas em configurações idênticas. Os resultados estão expressos como média ± EPM, * $p < 0,01$ .....	46
<b>Figura 8:</b> Análise da expressão de proteína $\alpha$ -AML por imunoblotting em anéis de aorta de ratas Wistar <b>CONT</b> e <b>TBT</b> . Os resultados estão expressos como média ± EPM. ** $p < 0,05$ .....	47
<b>Figura 9.</b> Gráfico representando curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratas Wistar na situação controle não tratadas ( <b>CONT</b> , n=8) e ratas tratadas com <b>TBT</b> (n=8). Os símbolos representam a média ± EPM. Test <i>t</i> não-pareado. * $p < 0,05$ .....	49

- Figura 10.** Gráficos representando curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratas Wistar **CONT**, n=10 (**A**) e **TBT**, n=7 (**B**), na presença (**E<sup>+</sup>**) e ausência do endotélio (**E<sup>-</sup>**). Diferença da área abaixo da curva, dAUC % (**C**). Os símbolos representam a média  $\pm$  EPM. Test *t* não-pareado. \*p<0,05..... 51
- Figura 11:** Gráficos representado o efeito do bloqueio da NOS por 30 minutos com L-NAME na curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratas **CONT** (**A**), n=8. (**B**) e em aorta de ratas tratadas com **TBT**, n=8. (**C**) Diferença da área abaixo da curva, dAUC %. Os símbolos representam a média  $\pm$  EPM. Test *t* não-pareado. \*p<0,05..... 53
- Figura 12:** Gráficos representando o efeito do bloqueio dos canais para K<sup>+</sup> por 30 minutos com TEA na curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratas **CONT** (**A**), n=8. (**B**) e em aorta de ratas tratadas com **TBT**, n=8. (**C**). Diferença da área abaixo da curva, dAUC %. Os símbolos representam a média  $\pm$  EPM. Test *t* não-pareado. \*p<0,05..... 55
- Figura 13:** Gráficos representando o efeito do bloqueio da NADPH oxidase por 30 minutos com apocinina na curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratas controle (**A**), n=8. (**B**) e em aorta de ratas tratadas com TBT, n=8. (**C**) Diferença da área abaixo da curva, dAUC %. Os símbolos representam a média  $\pm$  EPM. Test *t* não-pareado. \*p<0,05..... 57
- Figura 14:** Gráfico representando a curva concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis isolados de aorta de ratas Wistar na situação controle (**CONT**, n=7) comparadas com ratas tratadas com **TBT** (n=7). Os símbolos representam a média  $\pm$  EPM. Test *t* não-pareado. \*p<0,05..... 58
- Figura 15:** Gráfico representando a curva concentração-resposta a acetilcolina (ACh) em anéis isolados de aorta de ratas Wistar na situação controle (CONT, n=10) comparadas com ratas tratadas com TBT (n=10). Os símbolos representam a média  $\pm$  EPM. Test *t* não-pareado. \*p<0,05..... 59

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

$\alpha$ -AML – alfa actina de músculo liso

ACh – Acetilcolina

$[Ca^{2+}]_i$  – Cálcio intracelular

COE's- Compostos organoestânicos

CONT – Controle

DBT - Dibutilestanho

dAUC – Diferença da área sob a curva

EDRFs - Fatores Relaxantes Derivados do Endotélio

EDTA-Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

EDHF - Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio

EDCF - Fator de Contração Derivados do Endotélio

EPM – Erro Padrão da Média

ER $\alpha$  - Receptores de Estrogênio alfa

ER $\beta$  - Receptores de Estrogênio beta

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

ET1 – Endotelina1

E2 - Estrogênio

FE – Fenilefrina

iNOS – Óxido Nítrico Sintase induzida

ip - intraperitoneal

L - Litro

$\mu$ g – Microgramas

MLV - Músculo Liso Vascular

NADPH - nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NO - Óxido Nítrico

NPS – Nitroprussiato de Sódio

COE's – Compostos Organoestânicos

P4 - Progesterona

pD<sub>2</sub> - Log da concentração necessária para produzir 50 % do efeito máximo a fenilefrina

PGI<sub>2</sub> – Prostaglandinas

PVC - Cloreto de Polivinila

R<sub>máx</sub> – Resposta máxima

TBT – Tributilestanho

TPT – Trifenilestanho

## RESUMO

Os compostos triorganoestânicos, como o tributilestanho (TBT) são utilizados em tintas antiincrustantes por empresas marítimas, prejudicando o ecossistema marinho. O TBT inibe a aromatase, provocando o desenvolvimento do imposex que é a masculinização de fêmeas de moluscos. O estrogênio confere proteção ao sistema cardiovascular, atuando nos receptores de estrogênio presentes no endotélio e no músculo liso vascular. Neste estudo avaliamos os efeitos da exposição por 15 dias ao TBT (100 ng/kg, via oral) sobre a reatividade vascular à fenilefrina (FE) em anéis isolados de aorta de ratas Wistar (n=10, 230-250 g), divididas em grupos CONT (não tratado) e TBT. Anéis isolados de aorta, com e sem endotélio, foram utilizados para avaliação da reatividade vascular à FE (doses cumulativas  $10^{-10}$  –  $10^{-4}$  M). Os dados foram expressos como erro padrão da média ( $\pm$ EPM) da resposta máxima (Rmax) e sensibilidade (pD2) foram analisados por teste *t* de Student (não-pareado), as diferenças foram consideradas significantes quando  $p \leq 0,05$ . Os animais TBT apresentaram redução nas concentrações plasmáticas de estrogênio (CONT:  $47,2 \pm 7$  pg/mL vs TBT:  $32,3 \pm 4,3^*$  pg/mL,  $*p < 0,05$ ) e aumento nas concentrações plasmáticas de progesterona (CONT:  $4,0 \pm 0,7$  ng/mL TBT:  $7,0 \pm 1,2^*$  ng/mL,  $*p < 0,05$ ). A exposição ao TBT por 15 dias diminuiu a espessura e a área vascular dos anéis de aorta (CONT:  $0,46 \pm 0,06$  vs. TBT:  $0,19 \pm 0,04^*$   $\mu$ m; CONT:  $361,3 \pm 27,8$  vs TBT:  $241,8 \pm 11,2^*$   $\mu$ m<sup>2</sup>  $\times 10^3$ ,  $*p < 0,01$ , respectivamente). O TBT aumentou a deposição de colágeno nos anéis aórticos (CONT:  $7,2 \pm 1,0$  vs TBT:  $24,8 \pm 0,9^*$  %,  $*p < 0,05$ ). A intensidade da fluorescência, produzida pela oxidação do dihidroetideo, foi maior no grupo TBT indicando um aumento na produção de O<sub>2</sub><sup>-</sup> vs CONT,  $*p < 0,01$ . A expressão da proteína alfa actina de músculo liso reduziu nos anéis que sofreram exposição ao TBT (CONT:  $1,00 \pm 0,03$  vs TBT:  $0,67 \pm 0,06^*$ ,  $*p < 0,05$ ). O tratamento com TBT reduziu a Rmax à FE (CONT:  $143,4 \pm 6,1$  vs TBT:  $119,1 \pm 8,5^*$  % de contração ao KCl,  $*p < 0,05$ ). A remoção do endotélio promoveu resposta constritora maior no TBT (CONT:  $152,6 \pm 8,27$  vs TBT:  $194,7 \pm 17,98^*$  % de contração ao KCl,  $*p < 0,05$ ). A Rmax obtida durante à incubação com L-NAME foi maior no TBT (CONT:  $139,9 \pm 12,15$  vs TBT:  $150,9 \pm 6,85^*$  % de contração ao KCl  $*p < 0,05$ ). O bloqueio dos canais para K<sup>+</sup> promoveu uma resposta de maior intensidade nos animais TBT do que nos CONT, comprovado pela dAUC (área sobre a curva) (CONT:  $27,35 \pm 6,25$  vs TBT:  $72,9 \pm$

14,10\* % de contração ao KCl, \*p<0,05). A inibição da NADPH oxidase com apocinina reduziu a resposta contrátil a FE em ambos os grupos, porém no grupo TBT a redução foi maior (dAUC: CONT: -52,7 ± 5,2 vs TBT: -68,1 ± 4,5\* de contração ao KCl, \*p<0,05). No grupo TBT a sensibilidade ao nitroprussiato de sódio foi maior do que no CONT (pD2: -7,76 ± 0,00, vs TBT: -7,43 ± 0,14\*, \*p<0,05). O grupo TBT apresentou aumento tanto da sensibilidade como da resposta máxima à acetilcolina (CONT: pD2: -6,07 ± 0,01 vs TBT: -5,62 ± 0,02\*; Rmáx: CONT: -105,3 ± 0,15 vs TBT: -99,17 ± 1,09\*, \*p<0,05). Em conclusão, o tratamento de ratas com TBT durante 15 dias modificou a morfologia e reduziu a reatividade vascular à FE nos anéis isolados de aorta de ratas através de mecanismos dependentes da biodisponibilidade de NO, dos canais para K<sup>+</sup> e aumento do estresse oxidativo.

Palavras chave: Tributilestanho, reatividade vascular, endotélio, músculo liso vascular, estresse oxidativo.



## ABSTRACT

The organotin compound such as tributyltin (TBT) is used in antifouling paints for marine businesses, damaging the marine ecosystem. TBT inhibits aromatase, the enzyme that converts testosterone to estrogen, causes imposex phenomenon that is the masculinization of females of marine animals. The estrogen confers protection to the cardiovascular system, acting on estrogen receptors present on endothelial and vascular smooth muscle. This study evaluated the effects of exposure to TBT for 15 days (100 ng / kg, orally) on vascular reactivity to phenylephrine (PHE) in isolated aorta rings of female Wistar rats (n = 10, 230-250 g), divided in CONT (untreated) and TBT groups. Isolated aortic rings with and without endothelium, were used to evaluate the vascular reactivity to PHE (cumulative doses  $10^{-10}$  -  $10^{-4}$  M). Data were expressed as mean standard error ( $\pm$  SEM) and analyzed by unpaired Student *t* test, differences were considered significant when  $p < 0.05$ . The TBT animals showed a decrease in the  $17\beta$ -estradiol plasma levels CONT ( $47.2 \pm 7$  pg/mL vs. TBT:  $32.3 \pm 4.3^*$  pg/mL,  $*p < 0.05$ ) and progesterone levels were increased compared to the CONT ( $4.0 \pm 0.7$  ng/mL TBT:  $7.0 \pm 1.2^*$  ng/mL,  $*p < 0.05$ ). The aortic rings exhibited signs of atrophy after exposure for 15 days to TBT. (CONT:  $0.46 \pm 0.06$  vs TBT:  $0.19 \pm 0.04^*$  mm; CONT:  $361.3 \pm 27.8$  vs TBT:  $241.8 \pm 11.2^*$   $\mu\text{m}^2 \times 10^3$ ,  $*p < 0.01$  respectively). TBT damaged the morphology of aortic tissue by increasing collagen deposition compared to CONT ( $17.2 \pm 1.0$  vs TBT:  $24.8 \pm 0.9\%^*$ ,  $*p < 0.05$ ). The fluorescence intensity produced by the oxidation of dihydroetideo was higher in the TBT group showing an increase in production of  $\text{O}_2\cdot$  compared to CONT  $*p < 0.01$ . The expression of  $\alpha$ -SMA protein were decreased in rings exposed to TBT (CONT:  $1.00 \pm 0.03$  vs TBT:  $0.67 \pm 0.06^*$ ,  $*p < 0.05$ ). Treatment with TBT decreased the maximal response ( $\dot{E}_{\text{max}}$ ) to PHE compared to CONT ( $143.4 \pm 6.1$  vs TBT:  $119.1 \pm 8.5^*$  % of contraction to KCl,  $*p < 0.05$ ). Removal of the endothelium promoted higher constrictor response at TBT than CONT group ( $152.6 \pm 8.27$  vs TBT:  $194.7 \pm 17.98^*$  % of reduction to KCl,  $*p < 0.05$ ). The  $\dot{E}_{\text{max}}$  at incubation with L-NAME was higher compared to the TBT CONT group ( $139.9 \pm 12.15$  vs TBT:  $150.9 \pm 6.85^*$ , % of contraction to KCl,  $*p < 0.05$ ). The blocking of channels for  $\text{K}^+$  promoted a response of greater intensity in animals TBT than in CONT, evidenced by dAUC (area under the curve) (CONT:  $27.35 \pm 6.25$  vs TBT:  $72.9 \pm 14.10^*$ , % of contraction to KCl,  $*p < 0.05$ ). Inhibition of NADPH oxidase with apocynin reduced the contractile response to PHE

in both groups, but the TBT group the reduction was greater (dAUC: CONT:  $-52.7 \pm 5.2$  vs TBT:  $-68.1 \pm 4.5^*$  contraction to KCl,  $*p < 0.05$ ). On TBT group the sensitivity (pD<sub>2</sub>) to sodium nitroprusside was higher than in the CONT group (pD<sub>2</sub>:  $-7.76 \pm 0.00$  vs TBT:  $-7.43 \pm 0.14^*$ ,  $*p < 0.05$ ). The TBT group showed an increase in both sensitivity and maximal response to acetylcholine, compared to CONT (pD<sub>2</sub>:  $-6.07 \pm 0.01$  vs TBT:  $-5.62 \pm 0.02^*$ ; R<sub>max</sub>: CONT:  $-105.3 \pm 0.15$  vs TBT:  $-99.17 \pm 1.09^*$ ,  $*p < 0.05$ ). In conclusion, the treatment of rats for 15 days with TBT altered morphology, and reduced vascular reactivity in isolated aorta rings by mechanisms dependent on NO bioavailability, channels for K<sup>+</sup> and increased oxidative stress rings.

Keywords: Tributyltin, vascular reactivity, endothelium, estrogen receptors, vascular smooth muscle.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 A descoberta dos compostos organoestânicos e a utilização antropogênica

Em 1853 Sir Edward Frankland, iniciou um estudo sistemático sobre os compostos organoestânicos como o di-iodeto de dietilestanho e tetraetilestanho, porém não conseguiu determinar a funcionalidade de tais compostos. Em 1925 uma patente designou os COE's como agentes anti-traças apesar de não terem sido utilizados para tal funcionalidade e por volta de 1940, na Europa, o tributilestanho ficou conhecido graças à expansão da indústria de plástico e o cloreto de polivinila (PVC) passou a ser amplamente utilizado, pois tal composto era utilizado como estabilizador e inibidor da degradação do PVC, pelo efeito da luz e calor (Godoi; Favoreto; Silva 2003).

A utilização dos triorganoestânicos como biocidas iniciou-se por volta de 1950, após o Instituto de Química Orgânica de Utrecht ter realizado um estudo sistemático sobre a ação dos trialquilestânicos e triarilestânicos em fungos, bactérias, organismos aquáticos, parasitas e insetos, descobrindo então as propriedades biocidas e passando a explorá-las comercialmente. Desta forma a partir d meados de 1960, os compostos triorganoestânicos passaram a ser utilizados também em lavouras como pesticida, na fabricação de materiais de construção civil, em esmaltes e em tintas antiincrustantes. (Kimbrough, 1976).

Os compostos organoestânicos, como o Tributilestanho (TBT) e o Trifenilestanho (TPT) são utilizados como biocidas, fungicidas, na preservação de madeira, como agente desinfetante e também em tintas antiincrustantes em embarcações (Piver, 1973). Os níveis de toxicidade estão relacionados à concentração, tempo de exposição, biodisponibilidade e sensibilidade da biota, como também a persistência dos compostos organoestânicos no meio ambiente (De Carvalho Oliveira; Santelli, 2010).

## 1.2 Biodisponibilidade e bioacumulação do TBT ao longo da cadeia alimentar

O acúmulo dos compostos organoestânicos no ambiente é regulado pelos processos de degradação biótica e abiótica. O processo básico de degradação do TBT consiste na perda progressiva do grupo butil ligado ao átomo de estanho originando os seus derivados dibutilestanho (DBT) e monobutilestanho (MBT), essa remoção dos grupos orgânicos pode ser provocada pela radiação ultravioleta, ou por processos biológicos ou químicos. A degradação biológica é promovida principalmente por microalgas e bactérias, enquanto que a degradação química pode ser provocada por alguns ácidos e alquilmetais (Gadd, 2000; Hoch, 2001).

O tempo de meia vida ( $T_{1/2}$ ) e biodisponibilidade do TBT na água variam de alguns dias a algumas semanas e depende de vários parâmetros ambientais tais como: pH, temperatura, turbidez e luminosidade (Sarradin et al., 1995; Fent, 1996). A bioacumulação nos organismos deve-se ao fato do TBT ser lipofílico. Diversos organismos na base da cadeia trófica que vivem na água têm capacidade de acumular TBT e transferi-lo para os predadores e/ou consumidores, nomeadamente mamíferos e aves marinhas, conduzindo a uma acumulação ao longo das teias alimentares (Iwata et al., 1995; Tanabe et al., 1998; Takahashi et al., 1999;).

Nos organismos superiores, a acumulação ocorre preferencialmente através da dieta (Alzieu et al., 1998). A acumulação ao longo da cadeia alimentar pode ser influenciada pela capacidade que alguns organismos, tais como as bactérias, algas, crustáceos e peixes, têm de degradar o TBT em DBT e MBT. No entanto, os mecanismos de desintoxicação promovidos por estes organismos podem ser inibidos a elevadas concentrações ambientais de TBT (Alzieu, 2000).

A acumulação destes compostos ao longo da cadeia alimentar pode ter impactos sobre o homem através da ingestão de peixe e marisco contaminado [...]” (Chien et al., 2002). Estudos revelaram a existência de TBT, DBT e MBT em amostras de sangue e fígado humanos (Kannan; Falandysz, 1997; Takahashi et al., 1998).

Em águas estuarinas o  $T_{1/2}$  é aproximadamente 6-7 dias a 28°C; nas águas oceânicas o  $T_{1/2}$  aumenta para 17 dias à mesma temperatura. Os processos de degradação do TBT em sedimentos são mais lentos e o  $T_{1/2}$  pode variar entre 1.9 e 3.8 anos nos sedimentos profundos, de tal forma que os sedimentos foram apontados como o maior reservatório ambiental de TBT no ambiente marinho e estuarino (De Carvalho Oliveira; Santelli, 2010).

### **1.3 A causa da toxicidade dos COE's e suas diferentes ações no organismo**

Os compostos organoestanosos atingem sua toxicidade máxima quando os radicais orgânicos estão ligados ao átomo de estanho formando os compostos tóxicos, com atividade biológica aumentada como no caso dos triorganoestanosos, como o TBT (Snoeijs; Penninks; Seinen, 1987). A toxicidade dos compostos organoestânicos em vertebrados tem sido objeto de estudo, como o estudo em que o TBT e TPT, foram absorvidos pelo trato gastrointestinal dos roedores expostos. Além disto, altas concentrações de TBT e seus metabólitos foram encontrados no fígado e rins, estas concentrações foram maiores do que as encontradas no sangue e em outros tecidos, demonstrando que os COE's são potentes fontes de contaminação prevalentes em alimentos como peixes, frutos do mar, além de verduras e legumes onde os COE'S são utilizados como pesticida (Ohhira; Matsui; Watanabe, 1999).

O estudo de Cook, Jacobs e Reiter (1984) demonstrou que os compostos triorganoestânicos, como o trimetilestanho e trietilestanho, podem se distribuir no cérebro, rim, fígado, coração, sangue, bem como atravessar a barreira placentária, acumulando-se no tecido fetal de ratas. Em 1993, Penninks, propôs o nível de tolerância diária ao TBT para os seres humanos de 0,25 µg/kg baseados em estudos de imunotoxicidade. Este valor foi adotado pela Organização Mundial de Saúde-OMS, e o valor de 0,3 µg/kg foi proposto pela agência de proteção ambiental dos Estados Unidos-EPA/USA em 1997.

Dentre os diversos grupos de contaminantes orgânicos presentes em ecossistemas aquáticos, os COE's despontaram nos últimos anos com função biocida utilizados

como princípio ativo de tintas antiincrustantes. Essas tintas foram desenvolvidas com a finalidade de prevenir a incrustação em cascos de embarcações e em estruturas que necessitam estar em contato com a água do mar. Vários compostos têm sido utilizados como componentes ativos dessas tintas, entre eles podemos citar os compostos derivados de estanho (Almeida; Diamantino; De Sousa, 2007).

Os triorganoestânicos, como TBT e TPT, induzem a uma síndrome endócrina em várias espécies de gastrópodes, que é caracterizada pela superimposição da genitália masculina em fêmeas, alterando suas funções reprodutivas. A exposição aos COE's pode causar distúrbios no sistema reprodutivo de mamíferos do sexo feminino (Ogata et al., 2001; Omura et al., 2001; Grote et al., 2004). O TBT reduziu o número de células germinativas em aproximadamente 45% e induziu alterações morfofuncionais nos ovários de ratas (Kishta et al., 2007, Podratz et al., 2012), provocou falhas de implantação do óvulo e diminuiu o peso uterino (Ema et al., 1997).

Os compostos organoestânicos inibem de forma direta a enzima citocromo P450 aromatase que converte testosterona em estradiol, contribuindo para o aparecimento do aparato reprodutor masculino em fêmeas de gastrópodes (Snyder et al., 1999). Investigações ecotoxicológicas feitas por Smith em 1981 descreveram o imposex como um fenômeno onde ocorre a superimposição da genitália masculina em fêmeas; e em 1986 Gibbs e Bryan descreveram o mesmo fenômeno em suas pesquisas e Matthiessen e Gibbs (1998) demonstraram alterações no desenvolvimento sexual e reprodutivo de algumas espécies de gastrópodes expostos ao TBT. O tributilestanho inibe a produção da enzima aromatase responsável por converter testosterona em estrogênio, ocorrendo então um aumento na produção de testosterona que explica a masculinização de fêmeas de várias espécies aquáticas, porém este mecanismo de inibição por competição pelo sítio de ligação ainda não é bem compreendido (Nakanishi, 2008).

O mecanismo de ação do TBT que induz ao imposex permanece pouco claro, porém existem três hipóteses que tentam explicar o fenômeno: (1) inibição da enzima aromatase do citocromo P450, que converte a testosterona em estradiol (Snyder et

al., 1999), (2) a inibição da excreção de testosterona e (3) a teoria dos efeitos neuroendócrinos. Segundo a hipótese da inibição da aromatase o imposex ocorre devido ao aumento dos níveis de hormônios andrógenos nos organismos da seguinte forma: o TBT provoca distúrbios na síntese dos hormônios esteroides por intermédio da inibição da aromatização dos andrógenos (androstenediona e testosterona) a estrogênios (estrone e  $17\beta$  estradiol) através de uma inibição competitiva do citocromo P450 (Bettin; Oehlmann; Stroben, 1996).

Já a hipótese da inibição da excreção da testosterona descreve que o imposex ocorre devido ao aumento de níveis circulantes de testosterona devido a inibição da transferases e criptases (Ronis; Mason, 1996). Já a teoria dos efeitos neuroendócrinos o TBT atua diretamente nos neurohormônios que controlam o desenvolvimento sexual e a reprodução, ou seja, o TBT atua como uma neurotoxina provocando a liberação anormal de neuropeptídeos que são fatores morfogenéticos do pênis, conduzindo ao desenvolvimento de órgãos sexuais masculinos em fêmeas. (Oberdörster; McClellan-Green, 2000).

O TBT alterou o ciclo estral impedindo o desenvolvimento dos folículos ovarianos, levando a um desbalanço dos hormônios ovarianos, reduzindo o número de gonócitos e células germinativas, afetando o desenvolvimento sexual (Wester et al., 1990; Ogata et al., 2001).

Em recente estudo publicado por Dos Santos et al. (2012) os autores mostraram que o tratamento com TBT prejudicou a resposta vasodilatadora induzida pelo  $17\beta$ -estradiol em artérias coronárias de ratas. O efeito vasodilatador foi mediado tanto por um mecanismo direto no músculo liso vascular quanto indireto, via endotélio, nos grupos controle e tratado com TBT. Os autores mostraram que a pressão de perfusão coronariana basal foi maior nos grupos tratados com TBT provavelmente relacionado com a redução dos níveis circulantes de estrogênio.

O estudo de Dos Santos et al. (2012), foi o primeiro a demonstrar um prejuízo na resposta vasodilatadora endotelial aguda após administração de  $17\beta$ -estradiol em

corações isolados de ratas tratadas com TBT. Os autores propuseram que o aumento da pressão de perfusão coronariana observado no grupo TBT pode ser resultado de efeitos indireto do estrogênio sobre o sistema cardiovascular através de interações com o sistema renina-angiotensina (Xu et al., 2006), bem como alteração morfofuncional na estrutura endotelial, após exposição ao TBT (Dos Santos et al., 2012).

#### **1.4 Regulamentação mundial do uso do TBT como antiincrustante e o biomonitoramento no litoral do Espírito Santo**

Com a compreensão dos efeitos tóxicos do TBT, as primeiras regulamentações no uso do mesmo como biocida nas tintas antiincrustantes foram adotadas pelo Ministério Francês do Ambiente em 19 de Janeiro de 1982, em consequência do declínio na produção de ostras na Baía de Arcachon. Vários governos de outros países adotaram medidas internas após a divulgação dos efeitos nocivos deste xenocomposto sob a biota aquática (Sousa et al., 2009). A Tabela 1 mostra o sumário de algumas medidas legislativas:

**Tabela 1.**Resumo de medidas legislativas de alguns países sobre o uso do TBT

País	Ano	Legislação
França	1982	Proibição do uso de TBT em embarcações com comprimento inferior a 25 m;
Reino Unido	1986/87	Proibição da comercialização de tintas com mais de 7,5% de COE'S copolimerizados ou mais de 2,5% de COE'S livre; proibição do uso de TBT em embarcações com comprimento inferior a 25 m e no material de aquicultura;



Estados Unidos	1988	Proibição do uso de TBT em embarcações com comprimento inferior a 25 m; proibição do uso de tintas antiincrustantes com uma taxa de lixiviação do TBT superior a $1,6\mu\text{g Sn L}^{-1}$ dia;
Austrália	1988	Proibição do uso de TBT em embarcações com comprimento inferior a 25 m;
Canadá	1989	Proibição do uso de TBT em embarcações com comprimento inferior a 25 m;
Nova Zelândia	1993	Proibição do uso doméstico de tintas com TBT;
Portugal	1993	Proibição do uso de TBT em embarcações com comprimento inferior a 25 m; proibição do uso de tintas antiincrustantes com uma taxa de lixiviação do TBT superior a $1,6\mu\text{g Sn L}^{-1}$ dia;
Brasil	2005	Permitido o uso de $10\text{ ng.L}^{-1}$ a $370\text{ ng.L}^{-1}$ de TBT em águas salinas.

**Fonte:** Adaptada de Alzieu, 2000

Um estudo mostrou que concentrações na ordem de  $1\text{ ng.L}^{-1}$  já são suficientes para induzir a disfunções em organismos marinhos (Alzieu, 2000). No Brasil apesar de haver legislação, as concentrações permitidas são muito acima das preconizadas como seguras, além de não existir fiscalização específica sobre a regulamentação

do uso dos compostos triorganoestânicos, o que torna nossa costa contaminada. No estado de São Paulo algumas medidas de restrição sobre o uso do tributilestanho vêm sendo tomadas, porém o aparente desconhecimento dos efeitos nocivos e a falta de fiscalização efetiva é um dos entraves encontrados por órgãos federais e estaduais (Castro; Bemvenuti; Fillmann, 2007).

O Estado do Espírito Santo possui um extenso litoral, e o monitoramento da contaminação marítima por organoestânicos ainda não havia sido sistematizado. O Laboratório de Malacologia da Universidade Federal do Espírito Santo, sob a coordenação da Dra. Mércia B. Costa, iniciou estudos de biomonitoramento em alguns pontos do litoral capixaba e observou grande contaminação por organoestânicos, encontrando diversas fêmeas de gastrópodes imposexuadas (Costa et al., 2008).

### **1.5 O estrogênio e seus efeitos benéficos sobre o sistema cardiovascular**

Estudos epidemiológicos realizados pela Sociedade Brasileira de Hipertensão descrevem uma maior prevalência de doenças cardiovasculares em homens de 30 a 45 anos e em mulheres na menopausa não submetidas à terapia hormonal, comprovando um efeito protetor do estrogênio sobre o sistema cardiovascular e sugerindo diferenças sexuais na reatividade vascular (Ceravolo et al., 2007).

O estrógeno pode alterar o tônus do MLV indiretamente por modular a liberação e a atividade de fatores relaxantes e contráteis das células endoteliais. Além disso, o estrógeno exerce efeitos diretos sobre o MLV. Estudos em células de MLV isoladas de ratos demonstram que  $[Ca^{2+}]_i$  é menor em fêmeas do que em machos, sugerindo que existam diferenças sexuais nos mecanismos envolvidos no aporte de  $Ca^{2+}$  em células de MLV. [...] Esta diferença nas  $[Ca^{2+}]_i$  não estaria relacionada com mecanismos que envolvam liberação de  $Ca^{2+}$  dos estoques intracelulares, mas sim com a entrada de  $Ca^{2+}$  nas células de MLV. De fato, o aumento de  $[Ca^{2+}]_i$  após contração com fenilefrina é maior em ratas ovariectomizadas do que em fêmeas intactas e é reduzido pelo tratamento com estrógeno. Esse efeito do estrógeno sobre o aporte intracelular de  $Ca^{2+}$  pode ser explicado pelo fato de esse hormônio alterar a densidade e a permeabilidade dos canais de  $Ca^{2+}$  nas células de MLV (MURPHY; KHALIL, 2000, p. 834).

Em estudos experimentais (Kanashiro; Khalil, 2001) e clínicos (Crews; Khalil, 1999) foram descritos que a reatividade vascular a agentes contráteis é maior em homens

do que em mulheres da mesma idade, e que a castração dos ratos não altera a reatividade vascular. Em um passado recente os efeitos protetores do estrogênio eram atribuídos principalmente as suas ações sobre as concentrações séricas de lipídios, que diminuía o colesterol total e as concentrações de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), aumentando as concentrações de lipoproteínas de alta densidade (HDL). Entretanto, revisões literárias sugerem que o estrogênio atua diretamente sobre o sistema cardiovascular, modulando o tônus vascular, inibindo a migração e proliferação de células do músculo liso vascular, acelerando o crescimento das células endoteliais, inibindo agregação plaquetária, provocando relaxamento de segmentos arteriais, causando um efeito protetor (Abou-Mohamed et al., 2003).

### **1.6 O endotélio vascular como um órgão funcionalmente ativo**

O sistema vascular sanguíneo encontra-se revestido internamente por um epitélio simples pavimentoso originado do mesênquima, o endotélio, que é forrado por células musculares lisas e matriz extracelular. As ações dos hormônios sexuais na parede dos vasos incluem alteração ou modulação de fluxo iônico e de receptores nas células musculares lisas e modulação da produção e ativação dos fatores derivados do endotélio (Furchgot; Zawadzki, 1988; Jiang et al., 1991).

O endotélio vascular constitui uma interface ativa, situada entre a circulação e o restante da parede vascular. O endotélio intacto controla a permeabilidade vascular, regulando o tráfego de moléculas pequenas e grandes e mesmo de células. Provê uma interface não trombogênica entre o vaso e os componentes sanguíneos, mantém a fluidez do sangue e modula a vasomotricidade, ajustando o calibre dos vasos às constantes alterações hemodinâmicas e humorais locais e a própria estrutura vascular (Batlouni, 2001).

Local ativo de síntese, o endotélio pode ser considerado um verdadeiro sistema autócrino, parácrino e endócrino do organismo dos mamíferos que responde a vários estímulos, produzindo e secretando um grande número de compostos metabolicamente ativos, além de modular ou inibir os efeitos de substâncias circulantes. Sua integridade é essencial à regulação do tono vascular, do fluxo sanguíneo, da perfusão tissular e à proteção contra espasmo, trombose e à própria

aterogênese. Entre as múltiplas funções biológicas do endotélio, as relacionadas à vasomotricidade incluem liberação tanto de Fatores Relaxantes Derivados do Endotélio (EDRFs), tais como NO (Óxido Nítrico), prostaglandinas (PGI<sub>2</sub>), bradicinina e o Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio (EDHF), como também a liberação de Fatores de Contração Derivado do Endotélio (EDCFs) como endotelina-1 (ET-1), endoperóxidos (prostaglandina H<sub>2</sub> e tromboxano A<sub>2</sub>), Angiotensina II, tromboxano A<sub>2</sub> e espécies reativas de oxigênio (Martin et al., 1986; Coats et al., 2001).

Grande parte da vasodilatação causada pelos hormônios sexuais envolve a liberação de fatores derivados do endotélio, via ação em seus receptores e/ou diretamente (independente dos receptores). Os hormônios sexuais podem causar vasodilatação por liberarem os EDRFs como também por aumentarem sua biodisponibilidade de NO e/ou reduzirem a produção de ROS. Em mulheres na menopausa, o estrógeno aumenta a vasodilatação dependente do endotélio mediada pelo fluxo (Dantas et al., 1999).

Embora, outros estudos mostram que ocorre também ação direta do estrogênio no leito vascular, modulando canais de potássio e cálcio, ocasionando vasodilatação. O estrogênio ovariano possui um efeito protetor, causando vasodilatação dependente e independente do endotélio em corações isolados de ratas normotensas e SHR (espontaneamente hipertensas) (Santos et al., 2010).

Embasados no conhecimento de que o estrogênio pode promover vasodilatação de forma dependente e independente do endotélio e que o TBT causa uma disfunção ovariana com redução do estrogênio, nossa hipótese foi de que o tratamento de ratas por 15 dias com TBT poderia modificar a reatividade vascular dos anéis isolados de aorta.

## **2. OBJETIVO**

Investigar se o tratamento com 100 ng/Kg de Tributilestanho por 15 dias modifica a reatividade vascular de ratas.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS:

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Eletromecânica Cardíaca e Reatividade Vascular do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo. Foram utilizadas ratas fêmeas da linhagem Wistar (*Ratus norvegicus albinus*) fornecidas pelo biotério do Programa de Pós-Graduação, pesando entre 230 e 250 g, idade de 12 semanas, armazenadas em gaiolas com no máximo quatro animais, em temperatura entre 23-25° C, em ciclo claro/escuro de 12:12 horas fornecidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação, onde tiveram livre acesso à ingestão de água e ração. Todos os protocolos desenvolvidos foram aprovados pela Comissão de Ética-UFES para pesquisa com animais (CEUA-UFES 020/2009).

##### 3.1.1 Grupos experimentais:

Os animais foram separados, aleatoriamente nos seguintes grupos:

**Grupo Controle:** Não tratado (**CONT**, n=10), este grupo de animais foi submetido à gavagem, diariamente, com solução de etanol a 0,4 % diluída em água durante 15 dias.

**Grupo TBT:** Tratado com TBT (100 ng/Kg) (96% de pureza) pm = 325,5, Aldrich Milwaukee, USA), (**TBT**, n=10), este grupo de animais foi submetido à gavagem com solução de TBT durante 15 dias.

Todos os animais receberam água e ração *ad libitum* até o dia do sacrifício.

##### 3.1.1.1 Determinação das fases do ciclo estral

O ciclo estral foi determinado uma vez por dia por exame citológico do esfregaço vaginal obtido durante 2 semanas consecutivas antes de começar os experimentos e durante 15 dias do tratamento com o TBT como descrito por Marcondes et al.,

(2002). Todas as manhãs os animais eram levados à sala de experimento, onde a secreção vaginal era coletada com uma ponta que foi inserção na vagina das ratas (não profundamente), libertando solução salina, e, subsequentemente, aspirando o mesmo volume.

O fluido vaginal de cada rata foi coletado com uma ponta limpas e colocado em lâminas. Sendo uma lâmina diferente para cada gaiola de animais. O material não corado foi observado sob um microscópio de luz (Bel Photonics FLUO-2), sem o uso de lentes do condensador, com 10 × 40 × e lentes objetivas. A fase do ciclo estral foi determinada por citologia: predomínio de células epiteliais nucleadas (proestro); predomínio de células epiteliais cornificadas (estro); a presença de células e leucócitos (metaestro) epiteliais cornificadas e nucleadas; e predominância de leucócitos (diestro).

A frequência total de cada fase para cada animal observado neste período foi usado para calcular o comprimento total do proestro, estro, metaestro e diestro (em dias) e a duração do ciclo estral (Akamine et al., 2010;. Guerra et al. 2010;. Marcondes et al 2002). O percentual da ciclicidade estral foi determinado pelo número de ciclo estral regular/série do ciclo estral × 100. O programa de imagem Pro-plus 4.5.1(Media Cybernetics) foi usado para medir o número de células de esfregaço vaginal com 320 imagens de alta potência 320 capturadas (160 do grupo controle e 160 do grupo TBT) de cada esfregaço vaginal diariamente nos diferentes grupos experimentais. Todas as quantificações foram realizadas por um único observador.

### **3.1.2.1 Avaliação hormonal**

Para avaliação das concentrações circulantes dos esteroides sexuais no plasma, o sangue coletado centrifugado a 825 x g à 4° C por 10 minutos para a obtenção do plasma. Este foi estocado à -20°C para avaliação das concentrações séricas de progesterona, estradiol e testosterona por radioimunoensaio (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA). A análise das concentrações plasmáticas dos hormônios sexuais foi realizada no Laboratório de Patologia Celular da UFRJ.

## 3.2 PREPARAÇÃO DOS TECIDOS DA AORTA PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os animais foram perfundidos com solução salina 0,9% heparina (10 U/mL) via ventrículo esquerdo seguido de PBS-formalina (PBS-PF 4%). A aorta foi removida, dissecada manualmente fixada em PBS-PF 4%, em pH de 7.4, de 24 a 48 horas em temperatura ambiente. Após a fixação, os tecidos foram desidratados em etanol graduado, limpos em xilol, embebidos em parafina a 60°C e cortados em 5µm. Os cortes foram corados com Hematoxina & Eosina para visualização das túnica vasculares da aorta (Barreira et al., 2009). O processamento e análise microscópica foram realizados no Laboratório de Morfologia da Universidade Federal do Espírito Santo, Brasil.

### 3.2.1 Histomorfometria da parede dos anéis de aorta

O sistema de análise de imagem foi composto por uma câmera digital (Axio-Cam ERC 5S) acoplada a microscópio de luz (Olympus AX70; Olympus, Center Valley, PA). Imagens de alta resolução (2048 × 1536 pixels) foram capturadas com Carl Zeiss AxioVision Rel. 4.8. Fotomicrografias foram obtidas usando objetiva de 10x. A espessura da parede da aorta (que incluía todas as túnica/campo vascular) e a área da parede da aorta foram calculados com a ferramenta de medida de espessura/ área de AxioVision Rel. 4.8. Os resultados foram expressos como  $\pm$  EPM.

### 3.2.2 Densidade da superfície de colágeno

Os cortes corados com tricômio de Mallory foram utilizados para obter 15 microfotografias de tecido aórtico com resolução de objetiva de 20x. As áreas foram escolhidas aleatoriamente, e áreas sem todas as túnica vasculares foram cuidadosamente evitadas. As imagens foram convertidas em alto contraste em plano de fundo e imagens brancas para visualizar as fibras de colágeno coradas pelo programa Image J. Os resultados representam a porcentagem de colágeno na superfície total da parede da aorta, e é expressa como a média  $\pm$  EPM, como descrito por Dos Santos et al. (2012).



### 3.3 ESTUDO DA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E IMUNOBLOTTING

#### 3.3.1 Preparação do tecido e quantificação das proteínas

As aortas foram removidas e manualmente dissecadas como descrito previamente por Fiorim et al. (2011). Os tecidos foram homogeneizados com tampão de Lise (250 mmol/L de sacarose, 1 mmol/L EDTA, 20 mmol/L imidazol, pH 7.2, seguido de inibidores de protease: 1 mmol/L 4-(2-aminotil)-fluoreto de sulfonibenzeno, 1 mmol/L benzamida, 10 mg/L leupeptina, 1 mg/L pepstatina A, 1 mg/L aprotinina, e 1 mg/L quimostatina). A homogeneização foi realizada usando um homogeneizador Potter 0 °C. O homogenato foi centrifugado a 1000×g por 10 minutos. O sobrenadante foi salvo e o sedimento foi suspenso em três volumes do tampão de lise, e a centrifugação foi repetida. Ambos os sobrenadantes foram misturados e centrifugados a 10,000×g por 20 minutos. O sobrenadante foi guardado e o sedimento foi descartado. A concentração de proteínas foi determinada usando o ensaio de Lowry (1951).

#### 3.3.1 Western Blot para detecção de alfa actina de músculo liso ( $\alpha$ -AML)

As proteínas foram solubilizadas a 100° C durante 5 minutos em tampão de amostra (62,5 mM Tris-HCl, pH de 6.8, 2% de dodecilsulfato de sódio (SDS), 5% de glicerol, 0,01% azul de bromofenol, e 1,7% de mercaptoetanol), separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%) com quantidades iguais de proteína por poço (20 g). As proteínas foram transferidas para as membranas de nitrocelulose (Bio-Rad, Hercules, CA) em tampão de Tris-glicina.

As membranas foram bloqueadas com 5% de albumina de soro bovino (BSA, Sigma-Aldrich) em solução salina a 0,05% tamponada com solução de Tris Tween 20 (TBS-T) durante 1 hora, lavada uma vez durante 5 minutos em TBS-T e, em seguida, incubadas com anticorpo monoclonal de camundongo criado contra o domínio do terminal-C da  $\alpha$ -actina de músculo liso-1 ( $\alpha$ -AML diluída de 1:500 em BSA a 3% em TBS-T “overnight” a 4°C, Santa Cruz Biotechnology, INC) e/ou um anticorpo policlonal de coelho contra região C-terminal da  $\beta$ -actina de ratos ( $\beta$ -

Actina, diluída de 1:1000 em BSA a 3% em TBS-T “overnight” a 4 ° C, Santa Cruz Biotechnology, INC).

Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas três vezes com TBS-T, durante 10 minutos. A proteína  $\alpha$ -AML foi detectada utilizando anticorpo anti-coelho-IgG conjugado secundariamente a fosfatase alcalina (diluído a 1:1000 em BSA a 3% em TBS-T durante 1 hora, Sigma Immuno-chemicals), enquanto que a detecção de  $\beta$ -actina foi realizada utilizando um anticorpo IgG anti-rato conjugado com fosfatase alcalina (diluído a 1:4000 em BSA a 3% em TBS-T durante 1 hora Sigma Immuno Chemicals).

As bandas de  $\alpha$ -AML e suas respectivas  $\beta$ -actinas (usadas como controle interno) foram visualizadas cloreto de tetrazólio nitroazul (NBT) e 50 mg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo p-toluidina sal (BCIP) (Life Technologies, Rockville, MD), durante 5 minutos. As bandas de  $\alpha$ -AML e  $\beta$ -actina foram analisadas por densitometria utilizando o software Image J. A expressão relativa foi normalizada, dividindo o valor da  $\alpha$ -AML pelos correspondentes valores de controle interno ( $\beta$ -Actina).

### 3.4 QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DO ÂNION SUPERÓXIDO ( $O_2^-$ ) “*in situ*”.

#### 3.4.1 Fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetideo (DHE)

Para verificar a influência da exposição ao TBT sobre a produção de  $O_2^-$ , a fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetideo (DHE) foi utilizada como ensaio. O DHE é um derivado do etídio que entra em contato com  $O_2^-$ , oxida-se e, posteriormente se liga ao DNA das células emitindo fluorescência detectada pelo filtro vermelho. Este método permite uma análise da produção “*in situ*” tecidual. Os segmentos de aorta foram isolados, e mantidos por 1 hora em solução Krebs-Henseleit com sacarose 30%. Posteriormente, estes segmentos foram congelados em meio adequado (meio de congelamento, Tissue Tek-OCT). Assim, as amostras foram mantidas a -80° C até o dia do experimento.

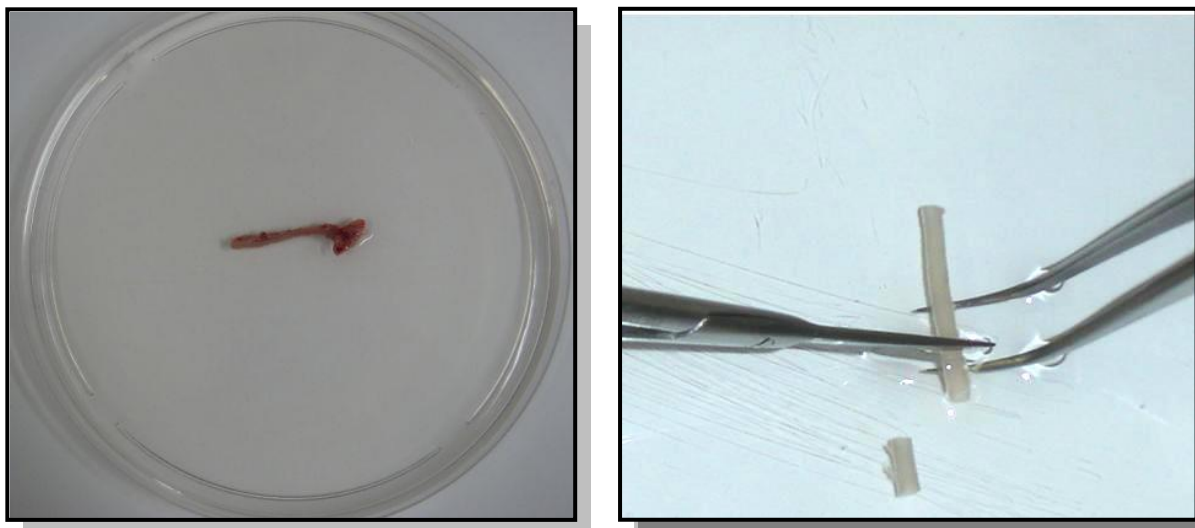
Os segmentos de aorta foram cortados no criostato em anéis com 8  $\mu$ m de espessura. Após este procedimento, as lâminas contendo os cortes foram lavadas e posteriormente incubadas com Krebs HEPES (Para 100 ml de Krebs: 29,4 mg de  $\text{CaCl}_2$ , 759 mg de NaCl, 41,7 mg de KCl, 4,9 mg de  $\text{MgCl}_2$ , 197,8 mg de HEPES e 198,2 de glicose) por 30 minutos em uma câmara úmida a 37° C. Decorridos os 30 minutos, o Krebs foi escorrido e o excesso seco. Em seguida, foi realizada incubação com dihidroetídio (DHE) por duas horas na estufa com câmara fechada a 37° C.

A luminescência emitida foi visualizada com microscópio de fluorescência confocal (Leica 2500 DM) e câmera fotográfica (NIKON digital sigth DS-U2) com filtro de fluorescência para DHE (vermelho). O etídeo unido ao núcleo das células foi visualizado com  $\lambda_{\text{exc}} = 585 \text{ nm}$  e detectado com  $\lambda_{\text{em}} = 600\text{-}700\text{nm}$ . As imagens foram quantificadas pelo programa NISS Element - BR. A intensidade do sinal no interior da camada média foi analisada em toda a circunferência das três seções do vaso por um mesmo investigador.

### 3.5 OBTENÇÃO DOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA TORÁCICA

#### 3.5.1 Preparação dos anéis de aorta

Após 15 dias de tratamento os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (35 mg/Kg, *ip*), aorta torácica foi retirada e colocada em uma placa de petri com solução de Krebs (composição em mM: NaCl 118; KCl 4,7;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2,5;  $\text{Mg SO}_4$  1,2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1, 17;  $\text{NaHCO}_3$  25; glicose 11; EDTA 0,01, aerada com mistura carbogênica contendo 5% de  $\text{CO}_2$  e 95% de  $\text{O}_2$ . Esta solução foi mantida com pH 7.4. As artérias foram divididas em segmentos cilíndricos de 3-4 mm de comprimento, livres dos tecidos conectivos e adiposo conforme Figura 1 (Angeli et al., 2011).

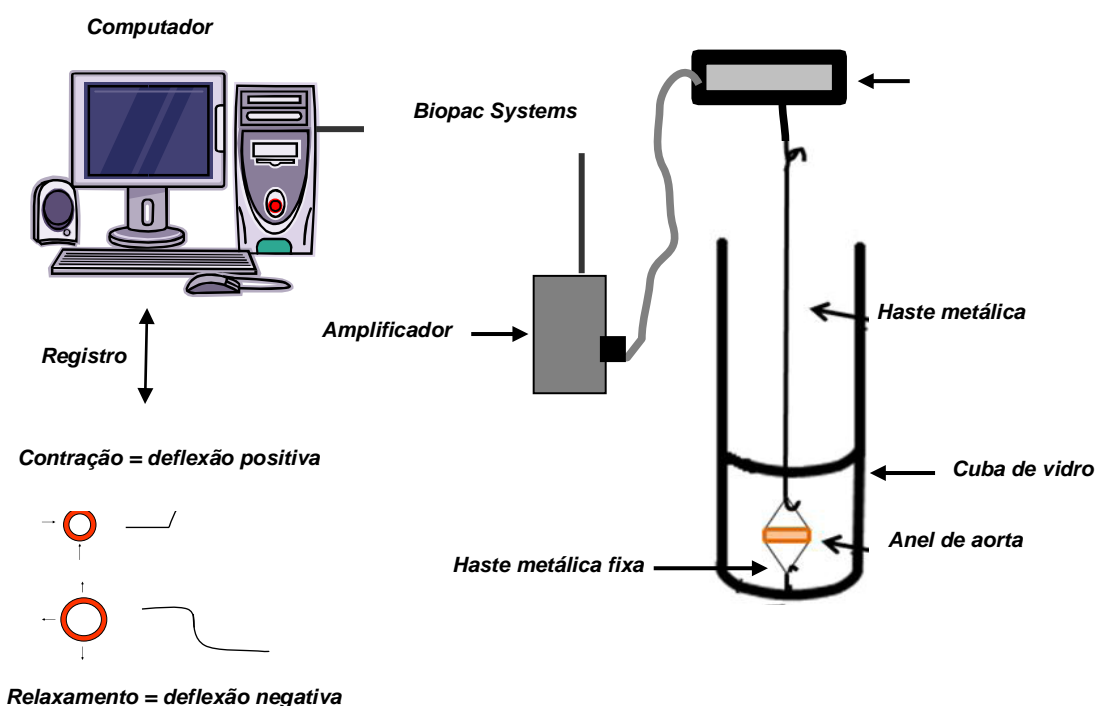


Fonte: Dissertação de Mestrado de Fiorim, 2011.

**Figura 1:** (A) Aorta torácica imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs, antes da manipulação para retirada do tecido conectivo e adiposo; (B) Após a retirada dos tecidos e sendo dividida em segmentos cilíndricos entre 3-4 mm.

### 3.5.2 Obtenção dos registros para estudo da reatividade vascular em anéis de aorta.

Cada anel da aorta torácica foi colocado em um banho com temperatura constante a 37° C, contendo 5 mL de solução de Krebs continuamente aerada com mistura carbogênica, mantendo um pH estável de 7.4. Duas hastes metálicas foram passadas através do lúmen dos segmentos, sendo que uma foi fixada à parede da cuba e outra conectada verticalmente a um transdutor de força (TSD 125) conectado a um sistema de aquisição de dados (MP 100 Biopac System, Inc; Santa Bárbara, CA-USA), e este a um computador (Figura 2).



Fonte: Tese de doutorado de Dias, 2011.

**Figura 2:** Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular “*in vitro*”. Sistema de aquisição de dados Biopac Systems (modificado de Dias, 2007).

Após a montagem, os anéis aórticos foram submetidos a uma tensão de repouso de 0,9 a 1,3 gramas, reajustada, quando necessário, durante 45 minutos de estabilização (Figura 3 A).

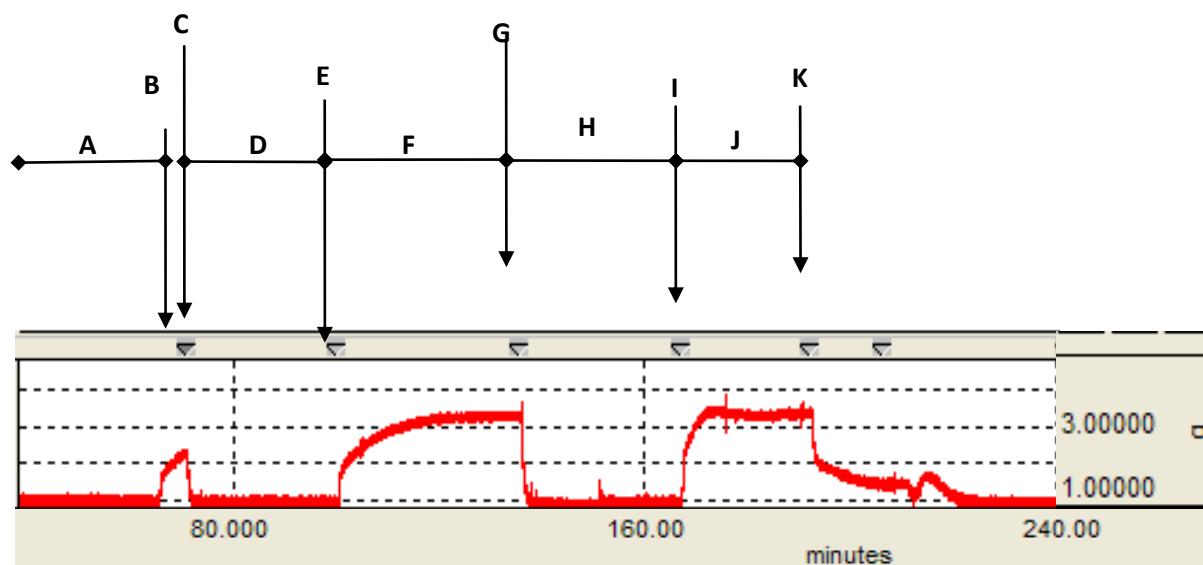
### 3.5.3 Avaliação da reatividade vascular ao cloreto de potássio (KCl)

Após o período de 45 minutos de estabilização, foi administrado ao banho KCl 75 mM para verificar a atividade contrátil do músculo liso vascular induzida por despolarização. Após atingirem uma variação de um grama de força a partir do valor basal, estes anéis eram lavados aproximadamente três vezes com solução de Krebs-Henseleit até retornar a tensão de repouso (Figura 3 B, C). Assim, os anéis que não obtiveram tal contração foram descartados. Após 30 minutos de estabilização (Figura 3 D), uma nova dose de KCl (75 mM) era adicionada ao banho para a aquisição de uma contração máxima do músculo liso vascular, aferida no

período de aproximadamente 30 minutos, tempo necessário para atingir um platô no registro da contração (Figura 3 E, F). Após este platô, os anéis foram novamente lavados três vezes para atingir o valor basal (0,9 a 1,3 gramas) e, depois de 30 minutos (Figura 3 G, H), esses anéis foram submetidos à avaliação da integridade funcional do endotélio.

### 3.5.4 Avaliação da integridade funcional do endotélio

A função endotelial foi avaliada através do relaxamento induzido pelo agonista muscarínico acetilcolina. Para tal, os anéis de aorta foram pré-contraídos com fenilefrina  $10^{-6}$  M. Uma vez atingido o platô, uma dose única de acetilcolina ( $10^{-5}$  M) foi aplicada (Figura 3 I, J, K). Os anéis que relaxaram menos que 80% do platô eram descartados. Os anéis sem endotélio relaxaram no máximo 10% ou até contraíram.



Fonte: Tese de doutorado de Dias, 2011.

**Figura 3:** Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio. Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCl: **A)** Período de estabilização inicial (45 min permanecendo na tensão de 1g); **B)** Adição de KCl (75 mM) ao banho; **C)** Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; **D)** Período de estabilização (30 min); **E)** Adição de KCl (75 mM) ao banho; **F)** Platô da contração induzida pelo KCl (75 mM); **G)** Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; **H)** Período de estabilização (30 min). Avaliação da integridade funcional do endotélio: **I)** Pré-contracção com fenilefrina (Fe)  $10^{-7}$  M; **J)** Platô da contração induzida pela Fe; **K)** Adição de acetilcolina (ACh)  $2 \times 10^{-6}$  M. O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical (modificado de Dias, 2011).

### 3.6 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

#### **3.6.1 Efeito do tratamento por 15 dias com tributilestanho sobre a resposta vasoconstritora a fenilefrina**

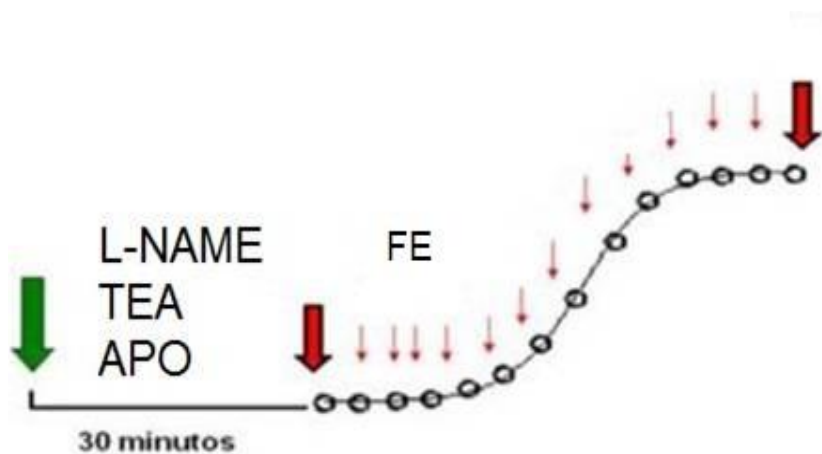
Após a avaliação da integridade funcional do endotélio, a solução nutritiva do banho foi trocada três vezes para que a tensão basal fosse restabelecida. Após os 30 minutos de estabilização foi realizada a curva concentração-resposta a fenilefrina ( $10^{-10}$  –  $3 \times 10^{-5}$  M) de maneira cumulativa nos dois grupos estudados.

#### **3.6.2 Efeito do tratamento por 15 dias com tributiestanho sobre a modulação do endotélio na resposta vasoconstritora a fenilefrina**

A fim de avaliar a capacidade do endotélio em modular a resposta constritora à fenilefrina, foram utilizados nos protocolos experimentais anéis de aorta com endotélio íntegro (E+) e sem endotélio (E-). As células endoteliais foram removidas mecanicamente através do uso de fios metálicos. Estes foram inseridos na luz do vaso e friccionados a sua íntima, ocasionando lesão do endotélio. A ausência do endotélio foi confirmada pela incapacidade da acetilcolina  $10^{-5}$  M induzir o relaxamento, após a pré-contracção com fenilefrina. A preparação foi lavada e, após 30 minutos de retorno a tensão basal, foram realizadas as curvas concentração-resposta a fenilefrina ( $10^{-10}$  a  $3 \times 10^{-5}$  M).

#### **3.6.3 Estudo dos fatores endoteliais envolvidos no tratamento por 15 dias com tributilestanho sobre a resposta a fenilefrina na aorta**

Todos os protocolos de reatividade vascular, a partir deste momento, foram realizados da mesma forma. Após o teste do endotélio e dos 30 minutos de estabilização da preparação, o fármaco a ser estudado era incubado por 30 minutos, e, logo após, realizada a curva concentração-resposta a fenilefrina ( $10^{-10}$  a  $3 \times 10^{-5}$  M) (Figura 4).



**Figura 4:** Esquema demonstrativo dos protocolos experimentais. Incubação com o fármaco a ser estudado e depois de trinta minutos realizou-se a curva concentração-resposta à FE ( $10^{-10}$  a  $3 \times 10^{-5}$  M (Angeli, 2009).

#### **3.6.4 Influência do tratamento por 15 dias com tributilestanho na via do óxido nítrico**

Para estudar a participação do óxido nítrico (NO) na resposta contrátil a fenilefrina, os anéis de aorta foram incubados com um inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS), o NG-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME, 100  $\mu$ M).

#### **3.6.5 Influência do tratamento por 15 dias com tributilestanho sobre os canais para $K^+$**

Com a finalidade de estudar a participação do fator hiperpolarizante derivado do endotélio na resposta contrátil induzida pela fenilefrina, os anéis foram incubados com tetraetilamônio (TEA) (10  $\mu$ M), um inibidor não específico dos canais para  $K^+$ .

#### **3.6.6 Envolvimento de radicais livres no tratamento por 15 dias com tributilestanho sobre a resposta contrátil a fenilefrina**

Para verificar o envolvimento de EROs sobre o tratamento por 15 dias na resposta contrátil a fenilefrina, apocinina (100  $\mu$ M), um inibidor seletivo de uma das principais enzimas formadoras de radicais livres, a NADPH oxidase foi utilizada.

#### **3.6.7 Efeito do tratamento por 15 dias com tributilestanho na resposta ao relaxamento dependente do endotélio**



A função endotelial foi avaliada através do relaxamento induzido pelo agonista muscarínico acetilcolina (ACh). Para tal, os anéis de aorta com endotélio foram pré-contraídos com fenilefrina  $10^{-6}$  M. Uma vez obtido o platô, foram realizadas as curvas concentração-resposta, cumulativas a acetilcolina ( $10^{-11}$  a  $3 \times 10^{-4}$  M).

### **3.6.8 Efeito do tratamento por 15 dias com Tributilestanho na resposta ao relaxamento independente do endotélio**

A avaliação da vasodilatação não mediada pelo endotélio foi analisada através do relaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio (NPS). Assim como para acetilcolina, os anéis foram pré-contraídos com fenilefrina  $10^{-6}$  M e, a seguir, foram realizadas curvas concentração-resposta a esse agonista em concentrações de  $10^{-11}$  a  $3 \times 10^{-4}$  M.

## **3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA:**

Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM). Para a análise estatística foi utilizado o teste *t* de Student não-pareado. Foram calculadas as respostas máximas ( $R_{\text{máx}}$ ) e o log da concentração necessária para produzir 50 % do efeito máximo a fenilefrina ( $pD_2$ ). Para comparar o efeito da remoção do endotélio nas respostas à fenilefrina dos grupos, alguns resultados foram expressos como diferenças das áreas sob as curvas concentração-resposta (dAUC). O nível de significância foi considerado quando  $p \leq 0,05$ .

## **3.8 DROGAS E REAGENTES UTILIZADOS:**

Acetilcolina, cloridrato (Sigma)  
Bicarbonato de Sódio (Merck)  
Citrato de Sódio (Reagen)  
Cloreto de Magnésio Heptahidratado (Merck)  
Cloreto de Potássio (Merck)  
Cloreto de Sódio (Merck)  
Cloridrato de Tributilestanho (Sigma)  
EDTA (Hoescht)  
Etanol absoluto (Sigma)

Fosfato de Potássio Monobásico (Cinética)

Fosfato de Sódio Monobásico (Merck)

Glicose (Reagen)

L-Fenilefrina, hidrocloreto (Sigma)

## 4. RESULTADOS

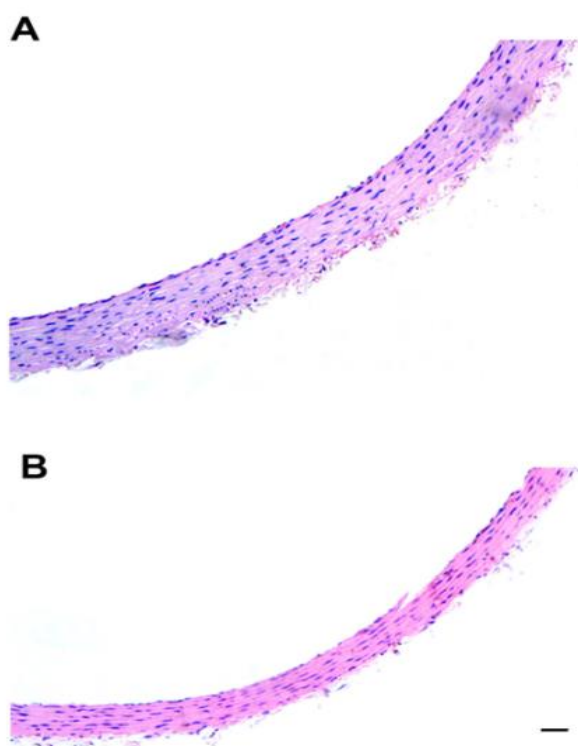
Os animais tratados com TBT apresentaram um decréscimo significativo nos níveis plasmáticos de estrogênio comparado ao CONT ( $47,2 \pm 7$  pg/mL vs TBT:  $32,3 \pm 4,3^*$  pg/mL,  $*p<0,05$ ). Adicionalmente os níveis de progesterona estavam aumentados quando comparado ao CONT ( $4,0 \pm 0,7$  ng/mL vs TBT:  $7,0 \pm 1,2^*$  ng/mL,  $*p<0,05$ ). Os níveis de testosterona e peso corporal não apresentaram diferença nos animais TBT. Ademais o grupo TBT apresentou aumento na proporção do peso do ventrículo esquerdo/peso corporal (CONT:  $0,020 \pm 0,01$  vs TBT:  $0,026 \pm 0,07^*$  mg/g,  $*p<0,05$ ), mas não alterou o peso do ventrículo direito/peso corporal (CONT:  $0,055 \pm 0,004$  vs TBT:  $0,066 \pm 0,004$  mg/g). Conforme apresentado na Tabela 2.

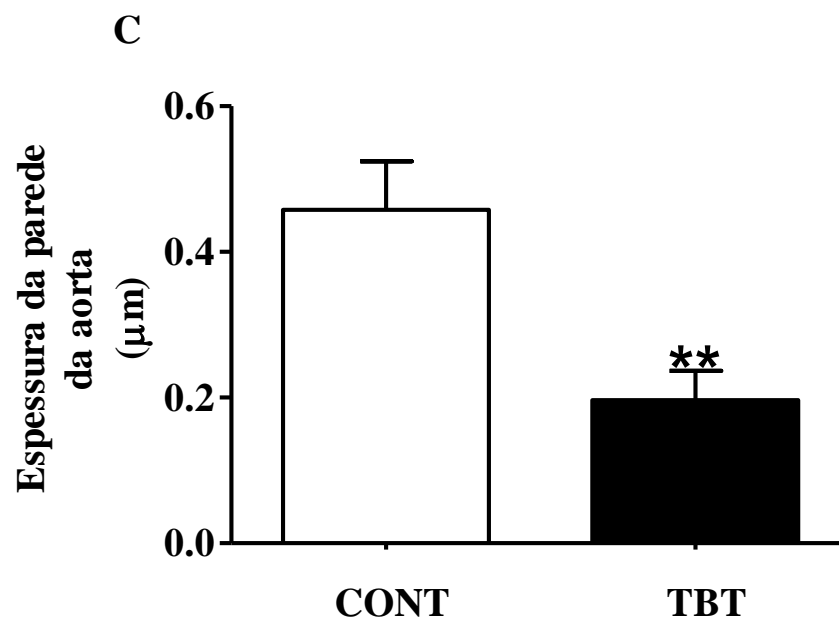
**Tabela 2:** Dados das concentrações plasmáticas de hormônios sexuais femininos, ingestão de alimentos, peso corporal e peso do coração de ratas Wistar **CONT** e **TBT** (100 ng/kg). Os valores são apresentados como a média  $\pm$  EPM. Teste *t* Student não pareado. \*  $p < 0,05$ . O 17-estradiol (E2) e progesterona (P4) e o peso dos ventrículos direito e esquerdo (incluiu o septo).

Grupos	CONT	TBT
E <sub>2</sub> , pg/mL	$47,2 \pm 7,0$	$32,3 \pm 4,3^*$
Testosterona	$4,8 \pm 0,8$	$4,3 \pm 0,2$
P <sub>4</sub> , ng/mL	$4,0 \pm 0,7$	$7,0 \pm 1,2^*$
Ingestão de ração, g/dia	$15,3 \pm 1,1$	$16,8 \pm 1,3$
Peso corporal inicial, g	$226,8 \pm 5,4$	$225,3 \pm 3,7$
Peso corporal final, g	$236,3 \pm 6,5$	$224,3 \pm 4,1$
Ventrículo direito/peso corporal mg/g	$0,055 \pm 0,004$	$0,066 \pm 0,004$
Ventrículo esquerdo/peso corporal mg/g	$0,020 \pm 0,01$	$0,026 \pm 0,07^*$

### Análise histológica dos anéis de aorta

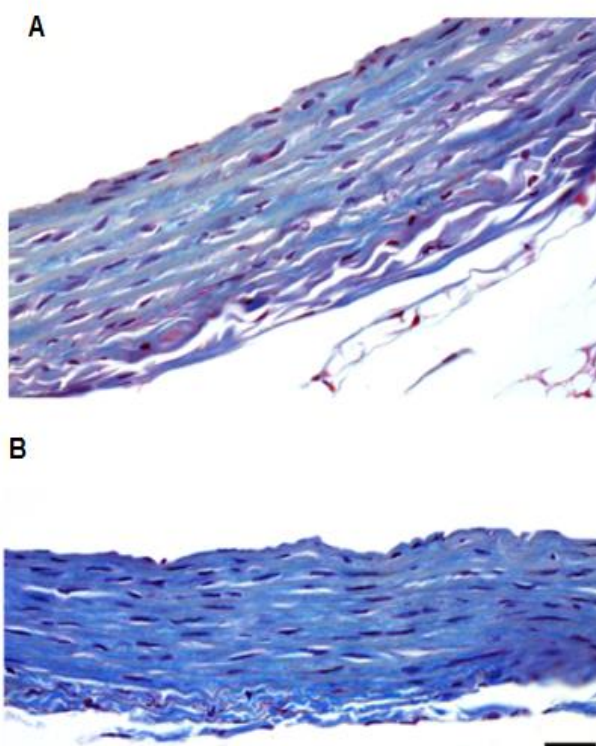
Os anéis de aorta exibiram sinais de atrofia após a exposição ao TBT por 15 dias. Conforme demonstrado na Figura 5 A-C nos animais tratados com TBT, tanto a espessura quanto a área da parede da aorta foram reduzidos em comparação com os animais controle (**CONT**:  $0,46 \pm 0,06$  vs **TBT**:  $0,19 \pm 0,04^{**}$   $\mu\text{m}$ ; **CONT**:  $361,3 \pm 27,8$  vs **TBT**:  $241,8 \pm 11,2^{**}$   $\mu\text{m}^2 \times 10^3$ ,  $^{**}p < 0,01$ ,  $n = 5$ , respectivamente).

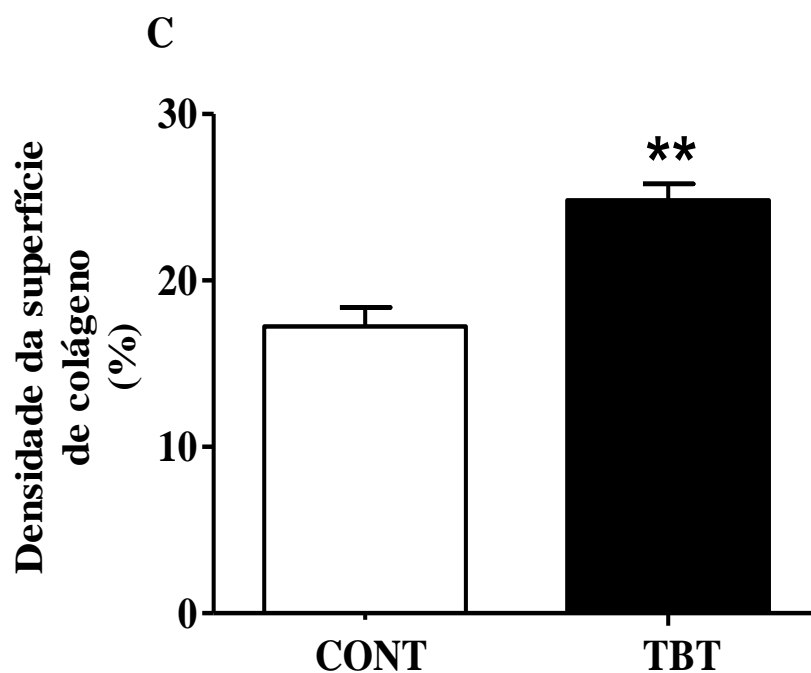




**Figura 5:** Fotomicrografias de anéis de aorta coradas com H&E dos grupos d **CONT** e **TBT** (100 ng/Kg por 15dias). **(A)** Anel da aorta **CONT** mostrando morfologia normal. **(B)** Anel de ratas tratadas com **TBT** mostrando sinais de atrofia vascular. **(C)** Representação gráfica da espessura da parede da aorta em ambos os grupos experimentais (média  $\pm$  EPM). \*  $p < 0,01$  vs CONT. Bar = 20  $\mu\text{M}$ .

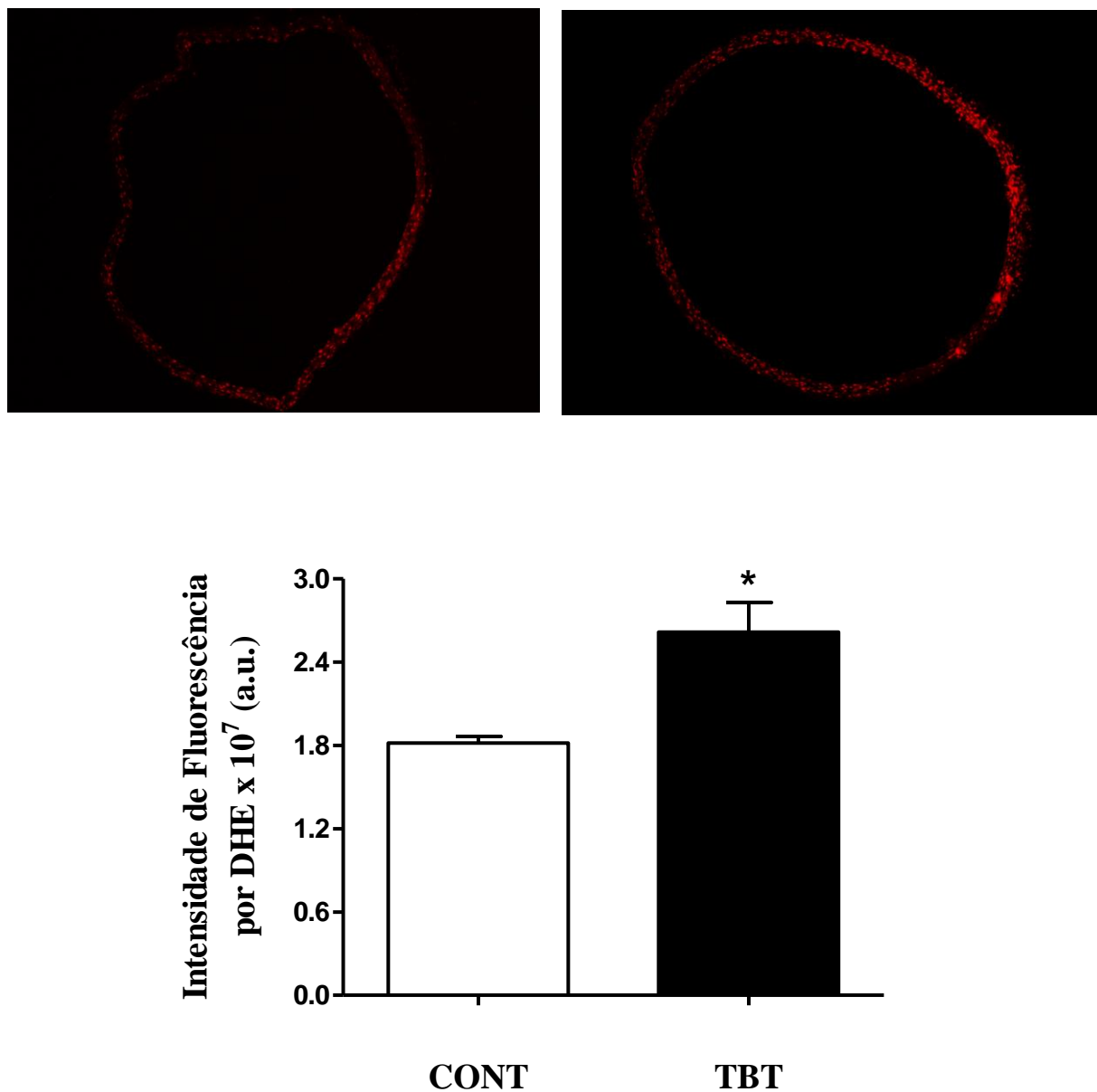
A deposição de colágeno foi significativamente maior no grupo TBT (entre as membranas elásticas), após coloração com tricrômio de Mallory (Fig. 6 A-C), em comparação com o grupo controle (CONT:  $17,2 \pm 1,0$  vs TBT:  $24,8 \pm 0,9^{**}$  %,  $n = 5$  ,  $^{**}p < 0,05$ ), indicando que o TBT altera a morfologia do tecido vascular da aorta.





**Figura 6:** Deposição superficial de colágeno em anéis de aorta coradas tricrômico de Mallory. **(A)** Anel aórtico **CONT** com deposição normal de colágeno. **(B)** Anel aórtico tratado com **TBT** com aumento de colágeno superficial entre as lâminas elásticas. **(C)** Representação gráfica do aumento da densidade superficial do colágeno da aorta no grupo tratado com **TBT**. Dados expressos como média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs CONT. Bar= 20  $\mu$ m.

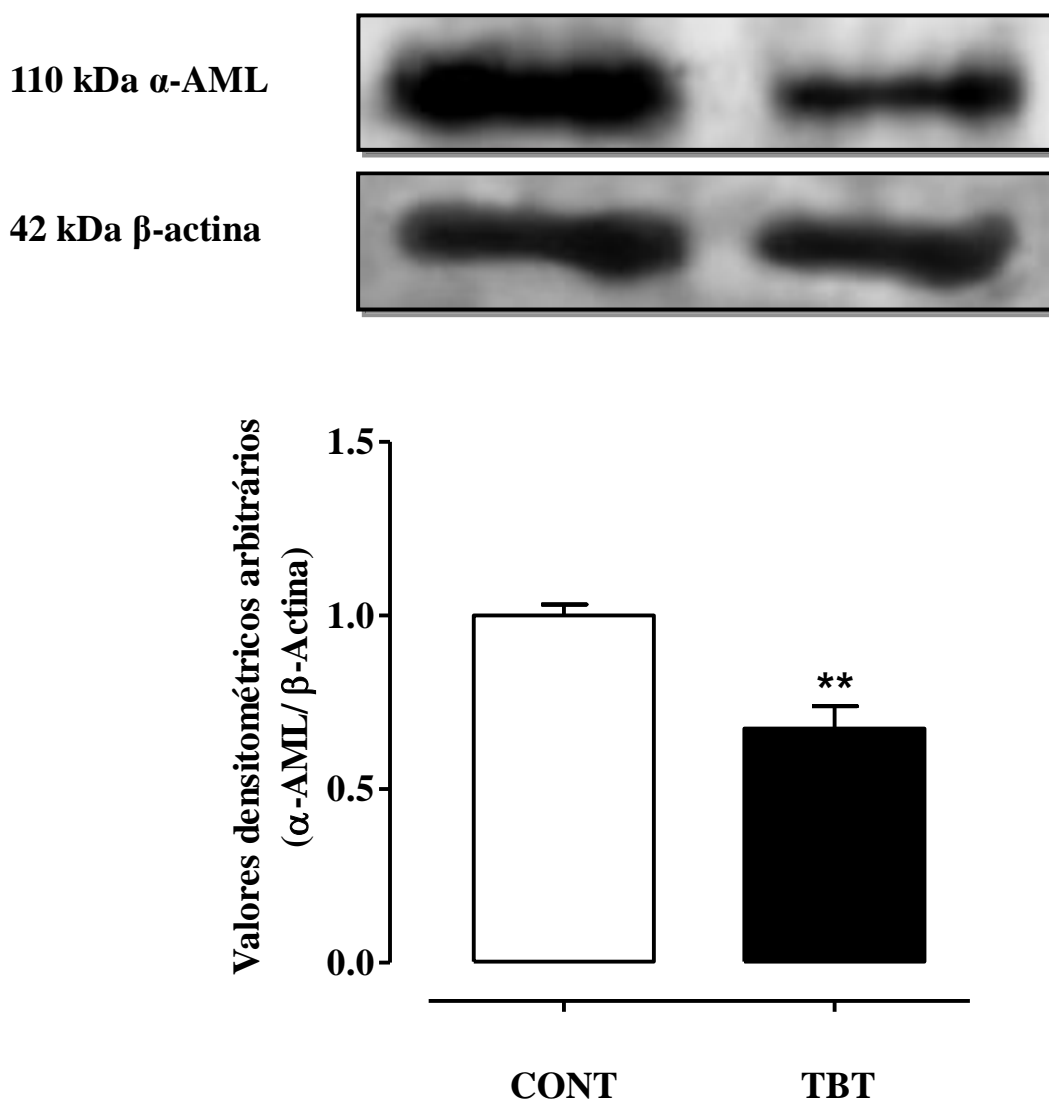
A presença de  $O_2^-$  na aorta torácica foi detectada usando criocortes de aorta com DHE sensível a fluorescência para detecção de  $O_2^-$ . As imagens obtidas por microscopia de fluorescência estão representadas na figura 7. A intensidade do sinal na aorta foi maior no grupo TBT\* em comparação com o CONT, \* $p < 0,01$ .



**Figura 7:** Detecção *in situ* de ânion superóxido. Micrografias de fluorescência de anéis de aorta corados com DHE  $O_2^-$ -sensível (fluorescência vermelha) foram obtidos a partir dos grupos **CONT** e **TBT**. As imagens foram adquiridas em configurações idênticas. \*  $p < 0,01$ .



A expressão da proteína  $\alpha$ -AML diminuiu nos anéis que sofreram exposição ao TBT comparados com os do grupo CONT ( $1,00 \pm 0,03$  vs TBT:  $0,67 \pm 0,06^{**}$ ,  $^{**}p<0,05$ ) conforme demonstra a figura abaixo.



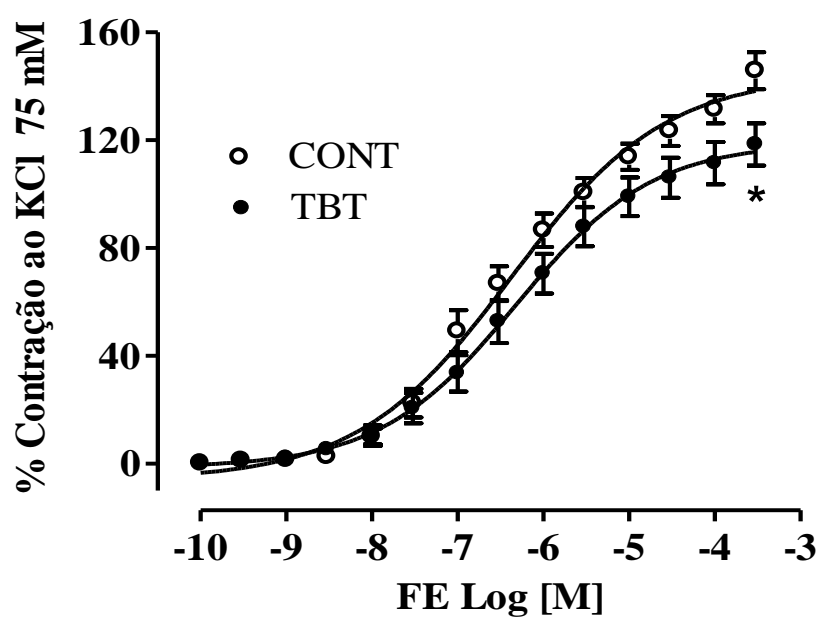
**Figura 8:** Análise por imunoblotting para a expressão de proteína  $\alpha$ -AML em anéis de aorta de ratas Wistar **CONT** e **TBT**. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM.  $^{**} p<0,05$ .

Avaliação do efeito do tratamento com TBT sobre a reatividade vascular nos anéis isolados de aorta

O tratamento por 15 dias com TBT não afetou a resposta contrátil ao KCl, porém reduziu a resposta vasoconstritora máxima (R<sub>máx</sub>) induzida pela fenilefrina em anéis de aorta (Tabela 3), CONT(n = 8): 143,4 ± 6,1 vs TBT( n = 9): 119,1 ± 8,5\*, \*p<0,05)

**Tabela 3.** Valores de pD<sub>2</sub> e resposta máxima (R<sub>máx</sub>) obtidos por curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de animais não tratados (**CONT**) e tratados (**TBT**). \*p<0,05.

<b>Grupos</b>	<b>pD<sub>2</sub> (Log M)</b>	<b>R<sub>máx</sub> (%)</b>
<b>CONT</b>	-6,411 ± 0,17	143,4 ± 6,09
<b>TBT</b>	-6,351 ± 0,15	119,1 ± 8,50*



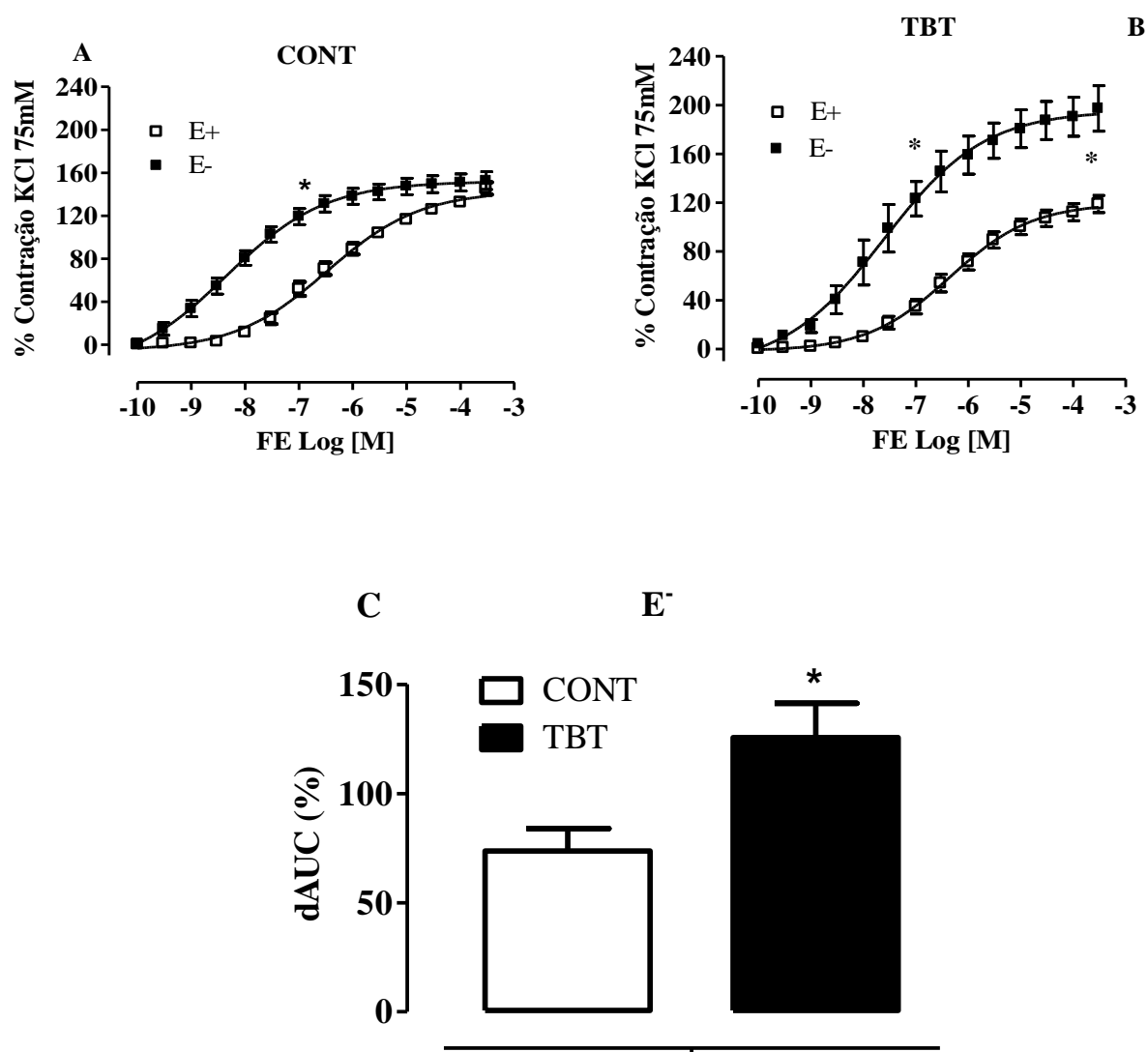
**Figura 9:** Curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratas Wistar na situação controle **CONT** (n=8) comparadas com ratas tratadas com **TBT** (n=9). Os símbolos representam a média  $\pm$  EPM. Test *t* não-pareado. \* $p < 0,05$ .

### Avaliação da participação do endotélio na reatividade vascular

Ao remover o endotélio, a curva concentração resposta à fenilefrina foi deslocada, para a esquerda conforme esperado, em ambos os grupos, porém a resposta máxima e sensibilidade à fenilefrina foram aumentadas no grupo TBT comparados ao grupo CONT (n = 10):  $152,6 \pm 8,27$  vs TBT (n = 7):  $194,7 \pm 17,98^*$  de contração ao KCl,  $*p < 0,05$ ). Houve diferença significativa na área abaixo da curva, conforme mostra a Tabela 4.

**Tabela 4.** Valores de  $pD_2$ , resposta máxima e área abaixo da curva obtidos através de curva concentração resposta à fenilefrina em anéis de aorta torácica de ratas sem endotélio controle (CONT) e tratadas (TBT).  $*p < 0,05$ .

Grupos	$pD_2$ (Log M)	$R_{m\acute{a}x}$ (%)	dAUC
CONT E+	$-6,50 \pm 0,16$	$142,8 \pm 5,17$	
TBT E+	$-6,35 \pm 0,13$	$119,5 \pm 7,62$	
CONT E-	$-11,22 \pm 2,08^*$	$152,6 \pm 8,27$	$73,62 \pm 10,40$
TBT E-	$-7,566 \pm 0,21^*$	$194,7 \pm 17,98^*$	$125,6 \pm 15,64^*$



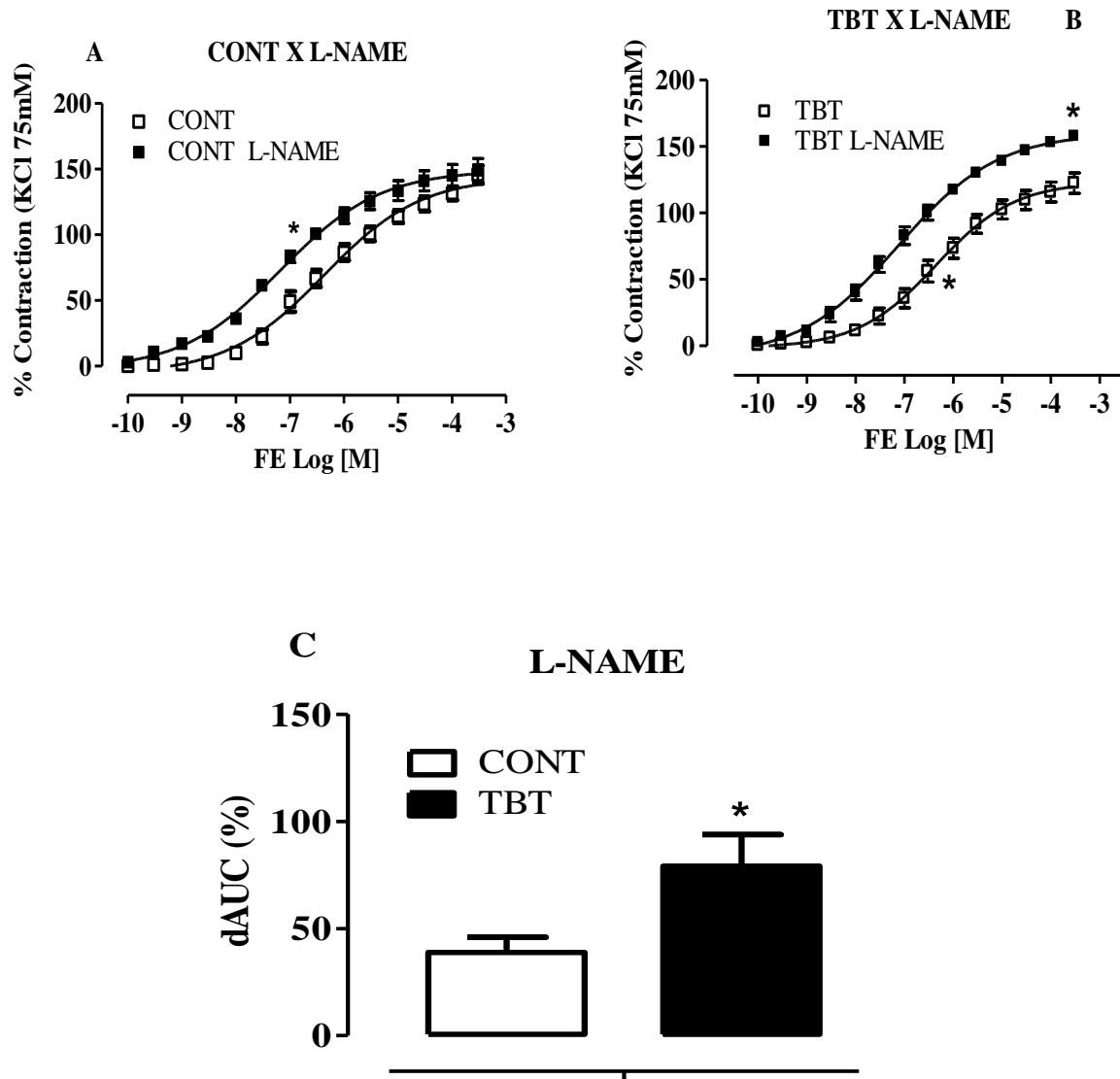
**Figura 10:** Curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar **CONT**, n=10 (**A**) e **TBT**, n=7 (**B**), na presença (**E**<sup>+</sup>) e ausência do endotélio (**E**<sup>-</sup>); Diferença da área abaixo da curva, dAUC % (**C**) Os símbolos representam a média ± EPM. Test *t* não-pareado. \*p<0,05.

# Análise do envolvimento do tratamento com TBT na via de produção de NO

Como esperado, ocorreu aumento da reatividade vascular em ambos os grupos incubados por 30 minutos com L-NAME, porém, no grupo TBT, observa-se um aumento maior na resposta ao L-NAME, comparado ao grupo CONT (R<sub>máx</sub>: CONT (n=9): 139,9 ± 12,15 vs TBT (n=9): 150,9 ± 6,85\*), \*p<0,05 conforme mostra a Tabela 5.

**Tabela 5.** Valores de pD<sub>2</sub>, resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e área sob a curva (dAUC) obtidos por curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de animais não tratados (**CONT**) e tratados (**TBT**) incubados com L-NAME. \*p<0,05.

Grupos	pD <sub>2</sub> (Log M)	R <sub>máx</sub> (%)	dAUC
<b>CONT</b>	-6,41 ± 0,17	143,4 ± 6,09	
<b>CONT L-NAME</b>	-11,36 ± 4,20*	139,9 ± 12,15	38,76 ± 7,19
<b>TBT</b>	-6,35 ± 0,15	123,5 ± 8,261	
<b>TBT L-NAME</b>	-7,63 ± 0,30*	150,9 ± 6,85*	79,11 ± 14,70*



**Figura 11:** (A) Efeito do bloqueio da NOS por 30 minutos com L-NAME na curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratas controle, n=8. (B) e em aorta de ratas tratadas com TBT, n=8. (C) Diferença da área abaixo da curva, dAUC %. Os símbolos representam a média  $\pm$  EPM. Test *t* não-pareado. \* $p < 0,05$ .

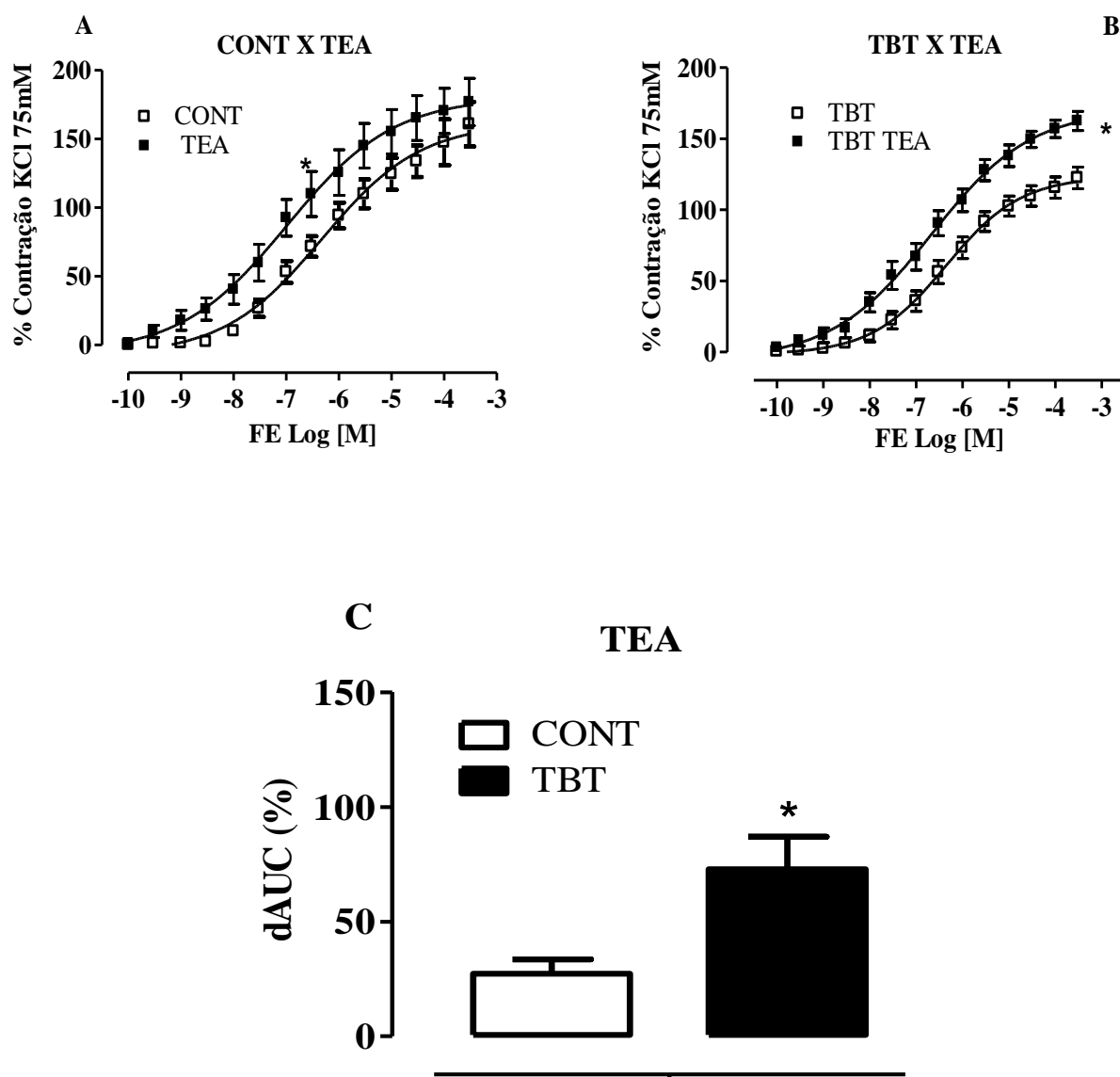
### Avaliação da participação dos canais para K<sup>+</sup> na resposta à FE

Após a incubação dos anéis de aorta de ambos os grupos por 30 minutos com TEA e realização da curva de FE, observou-se que a participação dos canais para K<sup>+</sup> foi intensificada em ambos os grupos, no entanto nos animais tratados com TBT, a área sob a curva foi maior do que no grupo CONT como observado na Tabela 6. Estes resultados sugerem uma maior participação dos canais para K<sup>+</sup> na curva de contração a fenilefrina no grupo TBT.

**Tabela 6.** Valores de pD<sub>2</sub>, resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e área sob a curva (dAUC) obtidos por curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de animais não tratados (**CONT**) e tratados (**TBT**) incubados com TEA. \*p<0,05.

Grupos	pD <sub>2</sub> (Log M)	R <sub>máx</sub> (%)	dAUC
<b>CONT</b>	-6,37 ± 0,16	161,7 ± 19,13	
<b>CONT TEA</b>	-6,93 ± 0,21	180,8 ± 17,89	27,35 ± 6,25
<b>TBT</b>	-6,35 ± 0,15	118,4 ± 7,86	
<b>TBT TEA</b>	-6,86 ± 0,38	179,0 ± 12,94*	72,9 ± 14,10*



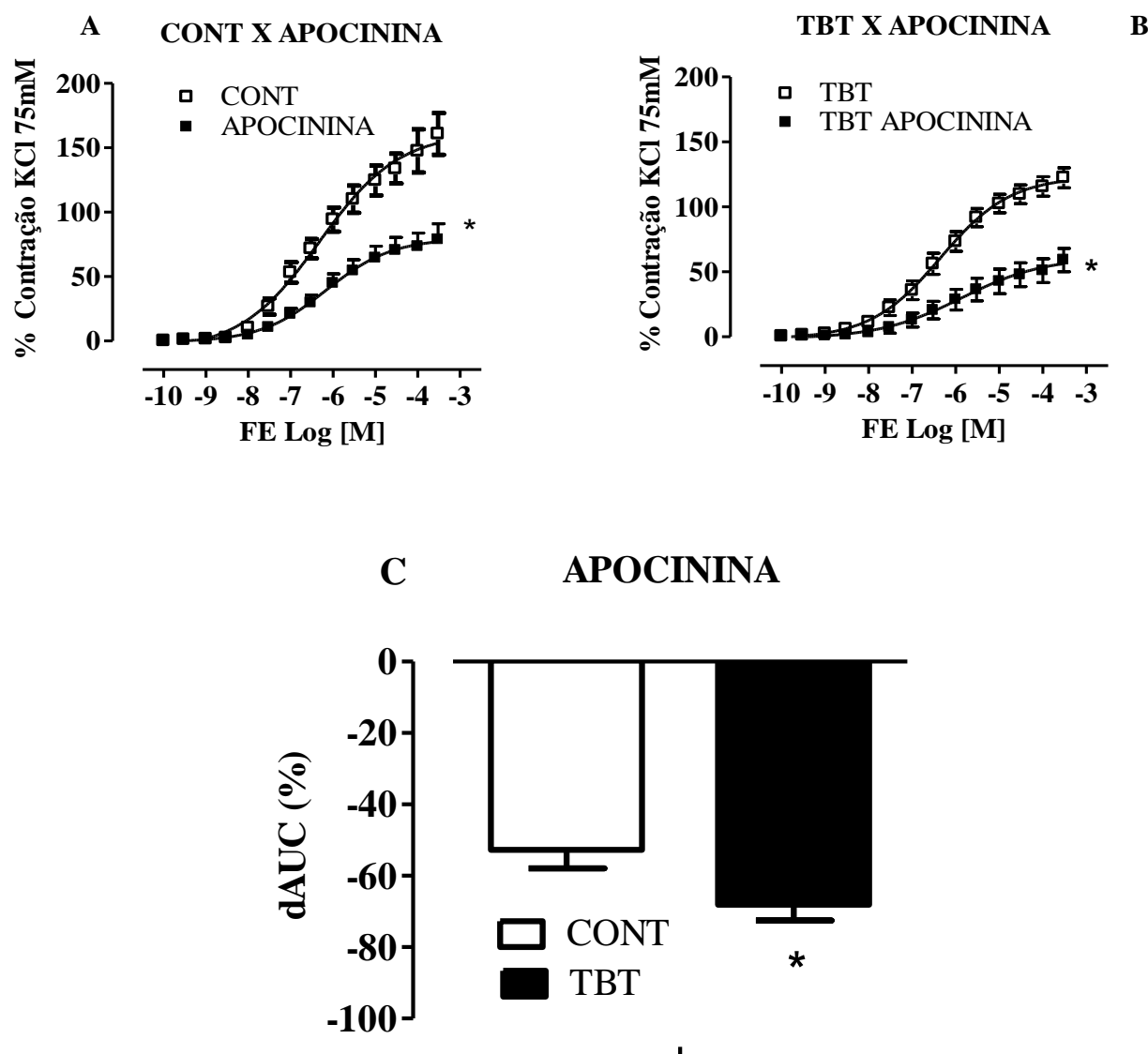


**Figura 12:** (A) Efeito do bloqueio dos canais para  $K^+$  por 30 minutos com TEA na curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratas controle,  $n=8$ . (B) e em aorta de ratas tratadas com TBT,  $n=8$ . (C) Diferença da área abaixo da curva, dAUC %. Os símbolos representam a média  $\pm$  EPM. Test  $t$  não-pareado. \* $p<0,05$ .

Quando investigamos o efeito do ânion superóxido liberado pela atividade da NADPH oxidase, observamos que conforme mostra a Tabela 7, a inibição com apocinina reduziu a resposta contrátil a fenilefrina em ambos os grupos, porém no grupo TBT a redução foi maior sugerindo um aumento na liberação de ânion superóxido gerado pela NADPH oxidase neste grupo (dAUC: CONT (n = 7):  $-52,7 \pm 5,2$  vs TBT (n = 7):  $-68,1 \pm 4,5^*$  de contração ao KCl,  $*p < 0,05$ ).

**Tabela 7.** Valores de  $pD_2$ , resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ) e área sob a curva (dAUC) obtidos por curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de animais não tratados (**CONT**) e tratados (**TBT**) incubados com Apocinina.  $*p < 0,05$ .

Grupos	$pD_2$ (Log M)	$R_{m\acute{a}x}$ (%)	dAUC
<b>CONT</b>	$-6,37 \pm 0,16$	$161,7 \pm 19,13$	
<b>CONT - APOCININA</b>	$-6,16 \pm 0,15$	$80,2 \pm 12,24^*$	$-52,7 \pm 5,20$
<b>TBT</b>	$-6,35 \pm 0,15$	$123,5 \pm 8,26$	
<b>TBT - APOCININA</b>	$-5,38 \pm 0,45$	$69,35 \pm 9,24^*$	$-68,1 \pm 4,51^*$

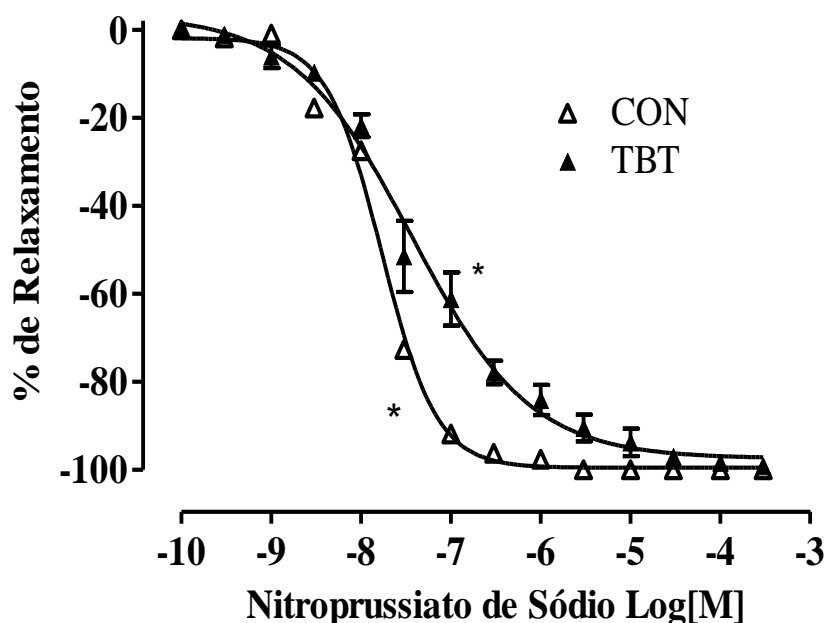


**Figura 13:** (A) Efeito do bloqueio da NADPH oxidase por 30 minutos com apocinina na curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratas controle, n=8. (B) e em aorta de ratas tratadas com TBT, n=8. (C) Diferença da área abaixo da curva, dAUC % . Os símbolos representam a média  $\pm$  EPM. Test *t* não-pareado. \* $p < 0,05$ .

Quando utilizamos o NPS para avaliar o relaxamento independente do endotélio, observamos que a resposta máxima foi semelhante em ambos os grupos, porém no grupo TBT a sensibilidade ao fármaco foi maior quando comparada ao grupo CONT (pD<sub>2</sub>: CONT (n = 7):  $-7,76 \pm 0,00$ , vs TBT (n = 6):  $-7,43 \pm 0,14^*$ ; R<sub>max</sub>: CONT (n = 7):  $-100 \pm 0,00$ , vs TBT (n = 6):  $-99,15 \pm 0,40$ , \*p<0,05 vs CONT), como discriminado na Tabela 8.

**Tabela 8.** Valores de pD<sub>2</sub>, e da resposta máxima (R<sub>máx</sub>) obtidos por curva concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio em anéis de aorta de animais não tratados (CONT) e tratados (TBT). \*p<0,05.

Grupos	pD <sub>2</sub> (Log M)	R <sub>máx</sub> (%)
CONT NPS	$-7,76 \pm 0,00$	$-100 \pm 0,00$
TBT NPS	$-7,43 \pm 0,14^*$	$-99,15 \pm 0,40$

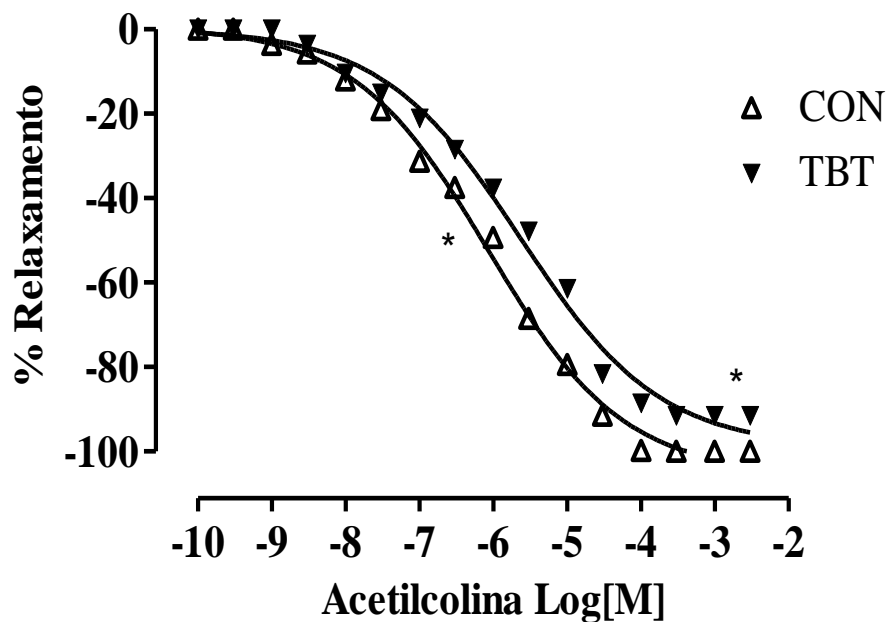


**Figura 14:** Curva concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis isolados de aorta de ratos Wistar na situação controle CONT (n=7) comparadas com ratos tratadas com TBT (n=7). Os símbolos representam a média  $\pm$  EPM. Test *t* não-pareado. \*p<0,05.

Ao avaliarmos a resposta ao relaxamento dependente do endotélio utilizando ACh, podemos observar que tanto a sensibilidade quanto as respostas máximas estão reduzidas no grupo TBT comparado ao grupo CONT (pD<sub>2</sub>: CONT (n = 10):  $-6,07 \pm 0,01$  vs TBT(n = 10):  $-5,62 \pm 0,02^*$ ; R<sub>max</sub>: CONT(n = 10):  $-105,3 \pm 0,15$  vs TBT(n = 10):  $-99,17 \pm 1,09^*$ , \*p<0,05), conforme indicado na Tabela 9.

**Tabela 9.** Valores de pD<sub>2</sub>, e da resposta máxima (R<sub>máx</sub>) obtidos por curva concentração-resposta acetilcolina em anéis de aorta de animais não tratados (**CONT**) e tratados (**TBT**). \*p<0,05

Grupos	pD <sub>2</sub> (Log M)	R <sub>máx</sub> (%)
CONT ACh	$-6,07 \pm 0,01$	$-105,3 \pm 0,15$
TBT ACh	$-5,62 \pm 0,02^*$	$-99,17 \pm 1,09^*$



**Figura 15:** Curva concentração-resposta a acetilcolina (ACh) em anéis isolados de aorta de ratas Wistar na situação controle **CONT** (n=10) comparadas com ratas tratadas com **TBT** (n=10). Os símbolos representam a média  $\pm$  EPM. Test *t* não-pareado. \*p<0,05.

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que mesmo sendo administrado em doses menores do que a quantidade encontrada nos oceanos ou ainda recomendado pela OMS e/ou EPA-USA, o tributilestanho diminuiu a reatividade de anéis isolados de aorta de ratas à fenilefrina por um mecanismo de alterações de fatores endoteliais como: aumento da liberação basal NO, maior participação dos canais para  $K^+$  e maior produção de ROS, prejudicando também o relaxamento induzido por NPS do músculo liso vascular.

Normalmente, a atividade tóxica máxima dos compostos organoestânicos ocorre na forma trissubstituídos e se o radical inorgânico ligado ao átomo de estanho for um composto tóxico a atividade biológica dos compostos organoestânicos pode ser aumentada (Snoeijs et al., 1987). Penninks em 1993 propôs uma dose diária tolerável de TBT para os seres humanos de 0,25  $\mu\text{g/kg}$  com base em estudos de imunotoxicidade. Este valor foi adotado pela OMS, e um valor um pouco maior (0,3  $\mu\text{g/kg}$ ) foi proposto pela EPA-USA em 1997. Investigações em ratos expostos à triorganoestânicos demonstraram que o mesmo se distribui no cérebro, fígado, rins, coração, sangue e pode atravessar a barreira placentária, acumulando-se no tecido fetal (Cook et al., 1984).

A toxicidade dos compostos organoestânicos em vertebrados tem sido um motivo de preocupação, pois estudos em roedores têm mostrado que o TBT e TPT são absorvidos no trato gastrointestinal e as concentrações de TPT e seus metabólitos no fígado e os rins são mais elevados do que as concentrações encontradas no sangue e outros tecidos. Os compostos organoestânicos persistem como prevalentes contaminantes em fontes alimentares como os peixes, mariscos, e por meio do uso de pesticidas em culturas de alimentos de alto valor (Oyewo, 1999), além da utilização de antifúngicos presentes em produtos que conservam a madeira, sistemas de água industriais e têxteis (Grün et al., 2006).

O papel do tributilestanho na regulação do tônus vascular continua sem explicação. Solomon e Krishnamurty (1992) demonstraram que o TBT não interferiu na

contração induzida pela norepinefrina ou no relaxamento induzido por nitroprussiato de sódio da aorta, e produziu uma inibição dose dependente do peptídeo natriurético atrial induzindo ao vasorelaxamento. Yoshizuka et al., (1992) descreveu lesões nas células endoteliais que resultaram em edema subendotelial, após exposição ao tributilestanho.

Neste estudo observa-se uma redução na reatividade à fenilefrina os anéis de aorta expostos ao TBT por 15 dias, além de modificações na morfologia. Investigando a modulação do NO ao incubar os anéis por 30 minutos com L-NAME observa-se um aumento na sensibilidade dos anéis à fenilefrina tanto no grupo CONT quanto no TBT, porém a sensibilidade foi maior no grupo TBT. Este resultado sugere que o efeito do TBT foi dependente do endotélio e do NO.

Os dados deste estudo também sugerem que o TBT tem sua ação independente do endotélio, pois no grupo TBT a sensibilidade ao NPS e ACh estão reduzidas o que leva a uma especulação que a ação do TBT pode ocorrer no músculo liso vascular além de endotélio. No entanto, as curvas de concentração-resposta à FE do grupo TBT e do CONT sem o endotélio não foram diferentes, podendo tal dado ser interpretado como uma ação parcial do TBT no acoplamento de excitação-contração do músculo liso, importante no processo de relaxamento, mas não no processo de contração.

No presente estudo, observou-se uma redução na concentração sérica de estrogênio e um aumento na concentração sérica de P4, após o tratamento com TBT. Em estudos anteriores, a P4 induziu o relaxamento da contração induzida por KCl de anéis de aorta de ratos, em parte devido ao NO endotélio-dependente que causou uma redução no tônus vascular, provavelmente devido ao bloqueio dos canais voltagem dependentes e/ou dos canais operados por receptores dependentes (Glusa et al., 1997).

É sabido que alterações na função de canal de  $K^+$  estão possivelmente envolvidas na modulação do tônus vascular em diferentes leitos vasculares (Yeung et al., 2007), muito embora alterações na reatividade vascular após a exposição a baixas concentrações de TBT não tenham sido anteriormente descritas. Em outras funções

fisiológicas, Tang et al., (2010) mostraram que o cloreto de trimetilestanho altera o equilíbrio de  $K^+$  renal, abrindo os canais para  $K^+$  nas células intercaladas renais de ratos Sprague-Dawley, reduzindo a reabsorção de  $K^+$  na urina e induzindo a hipocalemia. Em camundongos com células neuroblastoma N1E-115, nenhum dos compostos organoestânicos (TBT, DBT e TPT) alterou a corrente de  $K^+$  dependente de voltagem, no entanto em linfócitos humanos, o DBT afetou tanto o pico de amplitude quanto o tempo da corrente de  $K^+$  de maneira dependente da concentração.

O aumento da biodisponibilidade de NO pode abrir os canais para  $K^+$  e contribui para o aumento da modulação negativa da contração à FE. O presente estudo demonstrou que o TEA potencializou a resposta ao agonista  $\alpha$ -adrenérgico em ambos os grupos, porém este efeito foi maior em anéis das ratas expostas ao TBT, conforme valores demonstrados da área sob a curva levando então a constatação de que o efeito vasodilatador do TEA foi mais significativo e contribuiu para a redução da reatividade vascular à FE, sugerindo que o NO poderia ativar os canais para  $K^+$  do músculo liso vascular (Bolotina et al., 1994).

As espécies reativas de oxigênio (EROS) funcionam como segundo mensageiros ativando moléculas sinalizadoras, levando ao estresse oxidativo podendo afetar a reatividade vascular por diferentes mecanismos, assim desempenhando um papel importante na fisiopatologia vascular (Touyz; Schiffrin, 2004, 2008). Alvaréz et al., (2008) relataram que o aumento de ânion superóxido formado a partir da NADPH oxidase em vasos de ratos espontaneamente hipertensos contribui para a resposta vasoconstritora e se contrapõe ao aumento de NO a partir de iNOS e leva consequente modulação das respostas vasoconstritoras e vasodilatadoras.

O ânion superóxido é produzido por uma variedade de enzimas, incluindo xantina oxidase, ciclooxigenase e a NADPH oxidase. Esta última desempenha maior função nas células vasculares (Kawashima; Yokorama, 2010). A família da NADPH oxidase, apresenta um papel central na geração de EROS nas doenças cardiovasculares. Em timócitos de ratos, Gennari et al., (2000) demonstraram que o DBT e o TBT causaram estresse oxidativo e ativação das capazes. Corroborando com os resultados apresentados, a apocinina (inibidor inespecífico da NADPH oxidase)



reduziu a resposta à FE nos dois grupos, porém este efeito foi maior em segmentos de aorta de ratas expostas ao TBT, como demonstrado na dAUC.

O tratamento com apocinina promoveu um decréscimo expressivo no grupo TBT e a quantidade de  $O_2^-$  estavam aumentados no grupo TBT quando comparado ao CONT, tais achados sugerem que a exposição ao TBT levou a um aumento na atividade da NADPH oxidase sugerindo que o estresse oxidativo induzido pela enzima poderia reduzir a biodisponibilidade de NO. Além disso, a deficiência de E2 em células de músculo liso vascular de ratos foi associada com um aumento na liberação de ânion superóxido e atividade da NADPH oxidase e a reposição de E2 inibiu este aumento, enquanto que a reposição com P4 aumentou a produção de ROS e a atividade da NADPH-oxidase (Wassmann; Wassmann; Nickenig, 2005).

A aorta é um vaso de capacitância que permite a modificação das características do fluxo sanguíneo do ventrículo esquerdo a um bom padrão de fluxo não pulsátil em vasos mais distais (Safar et al., 1998). Além disso, grandes artérias não são consideradas condutos passivos, pois respondem ativamente as forças mecânicas a que são submetidas. Tal constatação é apoiada pelo fato de que algumas doenças cardiovasculares são acompanhadas por alterações vasculares que incluem hipertrofia e aumento no diâmetro das grandes artérias, em adição ao conceito de que a lesão das grandes artérias é um fator importante na morbidade e mortalidade cardiovascular. Em acordo com estes dados, a relação íntima-medial surgiu como índice de doenças cardiovasculares e é geralmente considerado um biomarcador de aterosclerose (Guo et al., 2006).

Os dados histológicos do presente estudo mostraram uma redução tanto de espessura quanto de área da parede da aorta no grupo TBT. Estes dados sugerem que a exposição ao TBT, durante 15 dias pode ter induzido alterações na morfologia da aorta associados com prejuízo na reatividade da aorta, geralmente observada em processo crônico como a hipertensão envelhecimento, diabetes mellitus e doença renal em estágio final. Foi previamente demonstrado que a deposição anormal de colágeno na parede arterial aórtica contribui para o aumento da rigidez arterial

(STEVENS et al., 1976) e em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (Marque et al., 2002), contribuindo para deficiência da função vascular.

A diminuição da reatividade vascular encontrada neste estudo pode estar associada as modificações na morfologia da aorta, e demonstra que a exposição ao TBT pode estar ligada diretamente a deficiência de um ou mais mecanismos vasculares como a diminuição da expressão da proteína  $\alpha$ -AML, aumento na deposição de colágeno ao longo da parede da aorta e/ou ainda outras modificações em sua matriz extracelular vascular como mecanismo compensatório pela toxicidade do TBT.

Doenças cardiovasculares, como a hipertensão ativam as células do músculo liso vascular, que são contribuintes essenciais para o remodelamento vascular (Hayashi; Naiki, 2009). As células do músculo liso vascular ativadas recuperam a sua capacidade proliferativa e migratória, secretam matrizes proteicas, fazem *down-regulation* de proteínas musculares lisas contráteis, tais como  $\alpha$ -AML, o músculo liso 22 $\alpha$  (ML22 $\alpha$ ), cadeia pesada de miosina de músculo liso, e calponina (Owens et al., 2004), como observado em SHR (Zhang et al., 2010). Portanto, os resultados encontrados neste estudo foram corroborados pelos citados, pois a exposição oral ao TBT resultou em uma diminuição na expressão da proteína  $\alpha$ -AML em anéis da aorta, sugerindo que a redução da reatividade vascular dos anéis de aorta do grupo TBT, pode ser explicada pelas modificações morfológicas e funcionais apresentadas neste estudo.

## 6. CONCLUSÃO

Concluimos que o tratamento por 15 dias com tributilestanho reduziu as concentrações circulantes de estrogênio, aumentou as concentrações de progesterona, atrofiou a parede dos anéis, aumentou a deposição de colágeno entre as membranas elásticas da aorta, aumentou a liberação de ROS, diminuiu a expressão da proteína contrátil  $\alpha$ -AML e reduziu a reatividade vascular à FE nos anéis isolados de aorta de ratas através de mecanismos dependentes da biodisponibilidade de NO, dos canais para  $K^+$  e aumento do estresse oxidativo.

## 7. REFERÊNCIAS

ABOU-MOHAMED, G.; ELMARAKBY, A.; CARRIER, G.O.; CATRAVAS, J. D.; CALDWELL, R. W.; WHITE, R. E. Estradiol relaxes rat aorta via endothelium-dependent and -independent mechanisms. **Pharmacol.** v. 69, n. 1, p. 20-6, 2003.

AKAMINE, E. H.; MARÇAL, A. C.; CAMPOREZ, J. P.; HOSHIDA, M. S.; CAPERUTO, L. C.; BEVILACQUA, E.; CARVALHO, C. R. Obesity induced by high-fat diet promotes insulin resistance in the ovary. **J. Endocrinol.** v. 206, p. 65–74, 2010.

ALMEIDA, E.; DIAMANTINO, T. C.; DE SOUSA, O. Marine paints: The particular case of antifouling paints. **Progress in Organic Coatings**, v. 59, n. 1, p. 2-20, 2007.

ALVARÉZ, Y.; BRIONES, A.M.; HERNANZ, R.; PÉREZ-GIRÓN, J. V.; ALONSO, M.J.; SALACEIS, M. Role of NADPH oxidase and iNOS in vasoconstrictor responses of vessels from hypertensive and normotensive rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, p. 926-935, 2008.

ALZIEU, C. Tributyltin: Case study of a chronic contaminant in the coastal environment. **Ocean & Coastal Management**, v. 40, n. 1, p. 23-36, 1998.

ALZIEU, C. Impact of Tributyltin on Marine Invertebrates. **Ecotox. J.**, v. 9, n. 1, p. 71-76, 2000.

ANGELI, J. K.; RAMOS, D. B.; CASALI, E. A.; SOUZA, D. O.; SARKIS, J. J.; STEFANON, I.; VASSALLO, D. V.; Fürstenau, C. R. Gadolinium increases the vascular reactivity of rat aortic rings. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 44, p. 445-452, 2011.

BATLOUNI, M. Endotélio e hipertensão arterial. **Rev. Brasileira de Hipert.** , v. 8, n. 3, p. 1-11, 2001.

BETTIN, C.; OEHLMANN, J.; STROBEN, E. TBT-induced imposex in marine neogastropods is mediated by an increasing androgen level. **Helgol. Meeres.** v. 50, p.299-317, 1996.

BOLOTINA, V. M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J. J.; PAGANO, P. J.; COHEN, R. A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature.** v. 368, p. 850–53, 1994.

BRAYNER, F. M. M.; SILVA, H. K. P.; BARBOSA, A. M. F. Speciation of heavy metals in estuarine sediments in the Northeast of Brazil. **Environ Sci. Pollut. Res.** v.2, p. 1-6, 2001.

CASTRO, I. B.; BEMVENUTI, C. E.; FILLMANN, G. Preliminary Appraisal of Imposex in Areas Under the Influence of Southern Brazilian Harbors. Campinas: **J. of the Brazilian Society of Ecotoxi.**, v. 2, n. 1, p.73-79, 2007.

CERAVOLO, G. S.; TOSTES, R. C.; FORTES, Z. B.; CARVALHO, M. H. C. Efeitos do estrogênio no sistema cardiovascular. **Rev. da Socied. Brasileira de Hipert.**, v. 4, n. 10, p. 122-123, 2007.

CHIEN, L. C.; HUNG, T. C.; CHOANG, K. Y.; YEH, C. Y.; MENG, P. J.; SHIEH, M. J.; HA B. C. Daily intake of TBT, Cu, Zn, Cd and As for fishermen in Taiwan. **Sci Total Environ.** v. 285, n. 1-3, p 177-85, 2002.

COATS, P.; JOHNSTON, F.; MACDONALD, J.; MCMURRAY, J. J. V.; HILLIER, C. Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor: Identification and Mechanisms of Action in Human Subcutaneous Resistance Arteries. **Circulation.** v. 103, p. 1702-1708, 2001.

COOK, L. L.; JACOBS, K. S.; REITER, L. W. Tin distribution in adult and neonatal rat brain following exposure to triethyltin. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v. 72, p. 75-81, 1984.

CORAY, C.; BARD, S. M. Persistence of Tributyltin-Induced Imposex in Dogwhelks (*Nucella lapillus*) and Intersex in Periwinkles (*Littorina littorea*) in Atlantic Canada. **J. water qual. resour.**, v. 42, n. 2, p, 111-122, 2007,

COSTA, M. B.; OTEGUI, M. B. P.; BARBIERO, D. C.; FERNANDEZ, M. A. S. *Cymatium parthenpeum parthenpeum* (von Salis, 1793) (Mesogastropoda:Ranellidae): A new bioindicator of organotin compounds contamination?. **J. of the Brazilian Society of Ecotoxi.**, v. 3, p. 65-69, 2008.

CREWS, J. K.; KHALIL, R. A. Antagonistic effects of 17 $\beta$ -Estradiol, progesterone, and testosterone on Ca<sup>2+</sup> entry mechanisms of coronary vasoconstriction. **J. Am. Heart Assoc.** v. 19, p.1034–1040, 1999.

DANTAS, A. P.; SCIVOLETTO, R.; FORTES, Z.B.; NIGRO, D.; CARVALHO, M. H. Influence of female sex hormones on endothelium-derived vasoconstrictor prostanoid generation in microvessels of spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 34, n.4, p. 914-919, out. 1999.

DE CARVALHO OLIVEIRA, R.; SANTELLI, R. E. Occurrence and chemical speciation analysis of organotin compounds in the environment: A review. **Talanta**, v. 82, p. 9–24, 2010.

DOS SANTOS, R. L.; PODRATZ, P. L.; SENA, G. C.; FILHO, V. S.; LOPES, P. F.; GONÇALVES, W. L.; ALVES, L. M.; SAMOTO, V. Y.; TAKIYA, C. M.; DE CASTRO MIGUEL E.; MOYSÉS, M. R.; GRACELI, J. B. Tributyltin impairs the coronary vasodilation induced by 17 $\beta$ -estradiol in isolated rat heart. **J. Toxicol. Environ. Health A**, v. 75, p. 948–959, 2012.

EMA, M.; HARAZONO, A.; MIYAWAKI, E.; OGAWA, Y. Effect of the day of administration on the developmental toxicity of tributyltin chloride in rats. **Arch Environ Contam Toxicol**. v. 33, n.1, p. 90-6, 1997.

FENT, K. Ecotoxicology of organotin compounds. **Critic. Rev. in Toxicol.**, v. 26, p. 3–117. 1996.

FENT, K. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. **Toxicology** v. 205, p. 223–240, 2004.

FILGUEIRAS, C. A. L. A química do estanho no século 18, ou como uma consulta se transformou num projeto de pesquisa. **Quim. Nova**, v. 25, n. 6, p. 1211-1219, 2002.

FIORIM, J.; RIBEIRO JÚNIOR, R. F.; SILVEIRA, E. A.; PADILHA, A. S.; VESCOVI, M. V.; DE JESUS, H. C.; STEFANON, I.; SALAICES, M.; VASSALLO, D. V. Low-level lead exposure increases systolic arterial pressure and endothelium-derived vasodilator factors in rat aortas. **PloS one**, v. 6, n. 1, p.17117, 2011.

FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, p.373–376, 1988.

GADD, G.M. Microbial interactions with tributyltin compounds: detoxification, accumulation, and environmental fate. **Sci. of the Total. Environ.**, v. 258, p.119-127, 2000.

GENNARI, A.; VIVIANI, B.; GALLI, C. L.; MARINOVICH, M.; PIETERS, R.; CORSINI, E. Organotins Induce apoptosis by disturbance of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and mitochondrial activity, causing oxidative stress and activation of caspases in rat thymocytes. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v. 169, p.185–190, 2000.

GIBBS, P.E.; BRYAN, G. M. Reproductive failure in populations of the dog-whelk *Nucella lapillus*, ceased by imposex induced by tributyltin from antifouling paints. **J. of the Marine Biol. Association**, v. 66, p. 767-777, 1986.

GLUSA, E.; GRÄSER, T.; WAGNER, S.; OETTEL, M. Mechanisms of relaxation of rat aorta in response to progesterone and synthetic progestins. **Maturit.** v. 28, p.181–191, 1997.

GODOI, A. F. L.; FAVORETO, R.; SILVA, M. S. Contaminação ambiental por compostos organoestânicos. **Rev.Quím. Nova**, v. 26, n. 5, p. 708-716, 2003.

GRAND, R. J.; PERRY, S. V.; WEEKS, R. A. Troponin C-like proteins (calmodulins) from mammalian smooth muscle and other tissues. **Biochem J.** ; v.177, n. 2 p. 521–9, 1979.

GROTE, K.; STAHLSCHMIDT, B.; TALSNESS, C. E.; GERICKE, C.; APPEL, K. E.; CHAHOUD, I. Effects of organotin compounds on pubertal male rats. **Toxicol.** v. 202, p. 145–158, 2004.

GRÜN, F.; WATANABE, H.; ZAMANIAN, Z.; MAEDA, L.; ARIMA, K.; CUBACHA, R.; GARDINER, D. M.; KANNO, J.; IGUCHI, T.; BLUMBERG, B. Endocrine disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. **Mol. Endocrinol.** v. 20, p. 2141–2155, 2006.

GUERRA, M. T.; SCARANO, W. R.; DE TOLEDO, F. C.; FRANCI, J. A.; KEMPINAS, W. DE G. Reproductive development and function of female rats exposed to di-ethyl-butyl-phthalate (DBP) in utero and during lactation. **Reprod. Toxicol.** v. 29, p. 99–105, 2010.

GUO, X.; OLDHAM, M. J.; KLEINMAN, M. T.; PHALEN, R. F.; KASSAB, G. S. Effect of cigarette smoking on nitric oxide, structural, and mechanical properties of mouse arteries. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** v. 291, p. 2354–2361, 2006.

HAYASHI, K.; NAIKI, T. Adaptation and remodeling of vascular wall; biomechanical response to hypertension. **J. Mech. Behav. Biomed. Mater.** v. 2, p. 3–19, 2009.

HOCH, M. Organotin compounds in the environment - an overview. **Appl. Geochem.** v. 16, n. 7-8, p. 719-743, 2001.

IWATA, H.; TANABE, S.; MIZUNO, T.; TATSUKAWA, R. High accumulation of toxic butyltins in marine mammals from Japanese coastal waters. **Environ. Sci. and Technol.** v. 29, p. 2959-2962, 1995.

JIANG, C.; SARREL, P.M.; LINDSAY, D.C.; POOLE-WILSON, P.A.; COLLINS, P. Endothelium- independent relaxation of rabbit coronary artery by 17 $\beta$ -estradiol in vitro. **Br J Pharmacol.** v. 104, p.1033–1037, 1991.

KANNAN, K.; FALANDYSZ, J. Butyltin residues in sediment, fish, fish-eating birds, harbour porpoise and human tissues from the Polish coast of the Baltic Sea. **Marin. Pollut. Bull.** v,34, n. 3, p. 203-207, 1997.

KANASHIRO, C. A.; KHALIL, R. A. Gender-related distinctions in protein kinase C activity in rat vascular smooth muscle. **Am J Physiol Cell Physiol.** v. 280, n. 1, p. C34-45, 2001.

KIMBROUGH, R. D. Toxicity and health effects of selected organotin compounds: a review. **Environ Health Perspect**, v. 14, p. 51-56, 1976.

KUUSI, T.; PYYSALO, H.; PIPPURI, A. The effect of iron, tin, aluminium, and chromium on fading, discoloration, and precipitation in berry and red beet juices. **Z Lebensm Unters Forsch**, v.163, n. 3, p. 196-202, 1977.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A.P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz. J. Biol.** v. 62, p. 609–14, 2002.

MARQUE, V.; GRIMA, M.; KIEFFER, P.; CAPDEVILLE-ATKINSON, C.; ATKINSON, J.; LARTAUD-IDJOUADIENE, I. Withdrawal reveals lack of effect of prolonged antihypertensive treatment on intrinsic aortic wall stiffness in senescent spontaneously hypertensive rats. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.** v. 29, p. 898–904, 2002.

MARTIN, W.; FURCHGOTT, R.F.; VILLANI, G.M.; JOTHIANANDAN, D. Depression of contractile responses in rat aorta by spontaneously released endothelium-derived relaxing factor (EDRF). **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v.237, p. 529–538, 1986.

MATTHIESSEN, P.; GIBBS, P. E. Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. **Environ.Toxicol. and Chem.**, v. 17, n. 1, p. 37-43, 1998.

MURPHY, J. G.; KHALIL, R. A. Gender-specific reduction in contractility and  $[Ca^{2+}]_i$  in vascular smooth muscle cells of female rat. **Am. J. Cell. Physiol.**, n. 278, p. 834–844, 2000.

NAKANISHI, T. Endocrine disruption induced by organotin compounds; organotins function as a powerful agonist for nuclear receptors rather than an aromatase inhibitor. **J. Toxicol. Sci.**, v. 33, n. 03, p. 269-276, 2008.



OBERDÖRSTER, E.; MCCLELLAN-GREEN, P. The neuropeptide APGWamide induces imposex in the mud snail, *Ilyanassa obsoleta*. **Pept.** v. 21, n. 9, p.1323-30, 2000.

OGATA, R.; OMURA, M.; SHIMASAKI, Y.; KUBO, K.; OSHIMA, Y.; AOU, S.; INOUE, N. Two-generation reproductive toxicity study of tributyltin chloride in female rats. **J. Toxicol. Environ. Health** v. 63, p.127–144, 2001.

OHHIRA, S.; MATSUI, H.; WATANABE, K. Effects of pretreatment with cytochrome P-450 inducers, especially phenobarbital on triphenyltin metabolism and toxicity in hamsters **Toxicol.**, v.137, p.151–159, 1999.

OMURA, M.; OGATA, R.; KUBO, K.; SHIMASAKI, Y.; AOU, S.; OSHIMA, Y.; TANAKA, A.; HIRATA, M.; MAKITA, Y.; INOUE, N. Two-generation reproductive toxicity study of tributyltin chloride in male rats. **Toxicol. Sci.** v. 64, p. 224–232, 2001.

OWENS, G. K.; KUMAR, M. S.; WAMHOFF, B. R. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. **Physiol. Rev.** v. 84, p.767–801, 2004.

OYEWO, E. O. Organotin compounds, fouling and the marine environment. **Ocean. Shore. Manag.**, v.12, p. 285-29, 1989.

PENNINKS, A. H. The evaluation of data-derived safety factors for bis(tri-n-butyltin) oxide. **Food Addit. Contam.** v. 10, p. 351–361, 1993.

PIVER, W. T. Organotin compounds: Industrial applications and biological investigation. **Environ. Health Perspect.** v. 4, p. 61–79, 1973.

PODRATZ, P. L.; DELGADO FILHO, V. S.; LOPES, P. F.; SENA, G. C.; MATSUMOTO, S. T.; SAMOTO, V. Y.; TAKIYA, C. M.; DE CASTRO MIGUEL, E.; SILVA, I. V.; GRACELI, J. B. Tributyltin Impairs the Reproductive Cycle in Female Rats. **J Toxicol Environ Health A.** v. 75, p.1035–1046, 2012.

POWERS, E.R; FOSTER, J.R; POWELL, W.J. JR. Interaction of interval-force relationship with aortic pressure and stroke volume. **Am J Physiol.** v. 230, n.4, p.893-900, 1976.

RONIS, M.J.J.; MASSON, A.Z. The metabolism of testosterone by the periwinkle (*Littorina littorea*) in vitro and in vivo: effects of tributyltin. **Marin. Environ. Reser.** v. 42, p. 161-166, 1996.

RODRIGUES, A. F. da S. Estanho no Amazonas. **Rev. Balan. Min. Dep.Nac. Prod. Min.**, p. 1-29, 2001.

SAFAR, M. E.; LONDON, G. M.; ASMAR, R.; FROHLICH, E. D. Recent advances on large arteries in hypertension. **Hypert.** v.32, p.156–161, 1998.

SANTOS, R. L; MARIN, E. B.; GONÇALVES, W. L.; BISSOLI, N. S.; ABREU, G. R.; MOYSÉS, M. R. Sex differences in the coronary vasodilation induced by 17  $\beta$ -oestradiol in the isolated perfused heart from spontaneously hypertensive rats. **Acta Physiol.**, v. 3, p. 203-210, 2010.

SARRADIN, P.M.; LAPAQUELLERIE, Y.; ASTRUC, M.; LATOUCHE, C.; ASTRUC, M. Long term behaviour and degradation kinetics of tributyltin in a marina sediment. **Sci of the Total Environ.**, v.170, p. 59-70, 1995.

SMITH, B. S. Tributyltin compounds induce male characteristics on female mud snails *Nassarius obsoletus* = *Ilyanassa obsolete*. **J. Appl. Toxicol.** v. 1, p. 141–144, 1981.

SNOEIJ, N. J. ; PENNINKS, A. H. ; SEINEN, W. Biological activity of organotin compounds- An overview. **Environ. Res.** v. 44, p. 335–353, 1987

SNYDER, S.A.; SNYDER, E.; VILLENEUVE, D.; KURUNTHACHALAM, K.; VILLALOBOS, A.; BLANKENSHIP, A.; GIESY, J. Instrumental and bioanalytical measures of endocrine disruptors in water. In: Keith, L.H., Jones-Lepp, T.L., Needham, L.L. (Eds.), Analysis of Environmental Endocrine Disruptors, ACS Symposium Series 747, v. 6. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 73–95, 1999.

SOLOMON, R.; KRISHNAMURTY, V. The effect of tributyltin chloride on vascular responses to atrial natriuretic peptide. **Toxicol.** v.76, p. 39–47, 1992.

SOUSA, A; LARANJEIRO, F.; TAKAHASHI, S.; TANABE, S.; BARROSO, C.M. Imposéx and organotin prevalence in a European post-legislative scenario: temporal trends from 2003 to 2008. **Chemosph.** v. 77, n. 4, p. 566-73, 2009.

STEVENS, R. L.; COLOMBO, M.; GONZALES, J. J.; HOLLANDER, W.; SCHMID, K. Os glicosaminoglicanos da artéria humana e suas mudanças na aterosclerose. **J. Clin. Invest.** v. 58, p. 470–481, 1976.

TAKAHASHI, S.; LEE, J. S.; TANABE, S.; KUBODERA, T. Contamination and specific accumulation of organochlorine and butyltin compounds in deep-sea organisms collected from Suruga Bay, Japan. **Sci. Total Environ.** v. 214, n. 1-3, p. 49-64, 1998.

TAKAHASHI, S.; TANABE, S.; TAKEUCHI, I.; MIYAZAKI, N. Distribution and Specific bioaccumulation of butyltin compounds in a Marine Ecosystem. **Environ. Contam. Toxicol.** v. 37, p. 50–61, 1999.

TANABE, S.; PRUDENTE, M.; MIZUNO, T.; HASEGAWA, J.; IWATA, H.; MIYAZAKI, N. Butyltin contamination in marine mammals from North Pacific and Asian coastal waters. **Environ. Sci. Technol.** v. 32, p. 193-198, 1998

TANG, X.; YANG, X.; LAI, G.; GUO, J.; XIA, L.; WU, B.; XIE, Y.; HUANG, M.; CHEN, J.; RUAN, X.; SUI, G.; GE, Y.; ZUO, W.; ZHAO, N.; ZHU, G.; ZHANG, J.; LI, L.; ZHOU, W. Mechanism underlying hypokalemia induced by trimethyltin chloride: Inhibition of  $H^+/K^+$ -ATPase in renal intercalated cells. **Toxicol.** v. 271, p.45–50, 2010.

TOUZY, R.M.; SCHIFFRIN, E.L. Reactive Oxygen Species in vascular biology: implications in hypertension. **Histochemistry and Cell Biology.** v. 122, p. 339-352, 2004.

TOUZY, R. M.; SCHIFFRIN, E.L. Reactive Oxygen Species and Hypertension: A complex association. **Antioxidants & Redox Signaling.** v.10, n. 6, p.1041-1044, 2008.

XU, L.; DIXIT, M. P.; NULLMEYER, K. D.; XU, H.; KIELA, P. R.; LYNCH, R. M.; GHISHAN, F. K. Regulation of  $Na^+/H^+$  exchanger-NHE3 by angiotensin-II in OKP cells. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1758, p. 519-526, 2006.

WASSMANN, K.; WASSMANN, S.; NICKENIG, G. Progesterone antagonizes the vasoprotective effect of estrogen on antioxidant enzyme expression and function. **Circ. Res.** v. 97, p.1046–1054, 2005.

WESTER, P.W.; KRAJNC, E.I.; VAN LEEUWEN, F.X.; LOEBER, J.G.; VAN DER HEIJDEN, C.A.; VAESSEN, H.A.; HELLEMAN, P.W. Chronic toxicity and

carcinogenicity of bis(tri-*n*-butyltin) oxide (TBTO) in the rat. **Food Chem. Toxicol.**, v.28 n. 3, p. 179–196, 1990.

YEUNG, S. Y. M.; PUCOVSKÝ, V.; MOFFATT, J. D.; SALDANHA, L.; SCHWAKE, M.; OHYA, S.; GREENWOOD, I. Molecular expression and pharmacological identification of a role for K<sub>v</sub>7 channels in murine vascular reactivity. **A. Br. J. Pharmacol.** v.151, p.758–770, 2007.

YOSHIZUKA, M.; HARA, K.; DOI, Y.; MORI, N.; YOKOYAMA, M.; ONO, E.; FUJIMOTO, S. The toxic effects of bis (tributyltin) oxide on the rat thoracic aorta. **Histol. Histopathol.** v. 7, p. 445–449, 1992.

ZHANG, L.; XIE, P.; WANG, J.; YANG, Q.; FANG, C.; ZHOU, S.; LI, J. Impaired peroxisome proliferator-activated receptor-gamma contributes to phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells during hypertension. **J. Biol.Chem.** v. 285, p.13666-13677, 2010.

Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology Letters

Journal homepage: [www.elsevier.com/locate/toxlet](http://www.elsevier.com/locate/toxlet)

## Tributyltin contributes in reducing the vascular reactivity to phenylephrine in isolated aortic rings from female rats



Samya Mere L. Rodrigues<sup>a</sup>, Carolina F. Ximenes<sup>a</sup>, Priscila R. de Batista<sup>a</sup>,  
Fabiana V. Simões<sup>a</sup>, Pedro Henrique P. Coser<sup>b</sup>, Gabriela C. Sena<sup>b</sup>, Priscila L. Podratz<sup>b</sup>,  
Leticia N.G. de Souza<sup>b</sup>, Dalton V. Vassallo<sup>a,c</sup>, Jones B. Graceli<sup>b,\*</sup>, Ivanita Stefanon<sup>a,\*,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Physiological Sciences, Federal University of Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil

<sup>b</sup> Department of Morphology, Federal University of Espírito Santo-UFES, Espírito Santo, Brazil

<sup>c</sup> Department of Physiology, EMESCAM, Espírito Santo, Brazil

### HIGHLIGHTS

- Tributyltin (TBT) reduces vasoconstrictor response in aortic rings of female rats.
- TBT decreases smooth muscle actin protein expression in aortic rings of female rats.
- TBT induces an endothelial dysfunction in aortic rings of female rats.
- Collagen deposition along aortic wall after 15 days of TBT exposure in female rats.
- TBT changes vascular reactivity dependent on NO, K<sup>+</sup> channels and oxidative stress.

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 11 September 2013

Received in revised form 1 January 2014

Accepted 2 January 2014

Available online 24 January 2014

#### Keywords:

Tributyltin

Estrogen

Vascular reactivity

PHE

Aorta rings.

### ABSTRACT

Organotin compounds such as tributyltin (TBT) are used as antifouling paints by shipping companies. TBT inhibits the aromatase responsible for the transformation of testosterone into estrogen. Our hypothesis is that TBT modulates the vascular reactivity of female rats. Female Wistar rats were treated daily (Control; CONT) or TBT (100 ng/kg) for 15 days. Rings from thoracic aortas were incubated with phenylephrine (PHE, 10<sup>-10</sup>–10<sup>-4</sup> M) in the presence and absence of endothelium, and in the presence of N<sup>G</sup>-Nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME), tetraethylammonium (TEA) and apocynin. TBT decreased plasma levels of estrogen and the vascular response to PHE. In the TBT group, the vascular reactivity was increased in the absence of endothelium, L-NAME and TEA. The decrease in PHE reactivity during incubation with apocynin was more evident in the TBT group. The sensitivity to acetylcholine (ACh) and sodium nitroprusside (SNP) was reduced in the TBT group. TBT increased collagen, reduced  $\alpha$ 1-smooth muscle actin. Female rats treated with TBT for 15 days showed morphology alteration of the aorta and decreased their vascular reactivity, probably due to mechanisms dependent on nitric oxide (NO) bioavailability, K<sup>+</sup> channels and an increase in oxidative stress.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: L-NAME, N<sup>G</sup>-Nitro-L-Arginine Methyl Ester; TBT, tributyltin; PHE, phenylephrine; ACh, acetylcholine; SNP, sodium nitroprusside; CONT, Control; NO, nitric oxide; TEA, tetraethylammonium; SR, sarcoplasmic reticulum; OTCs, Organotin compounds; ROS, reactive oxygen species; VSMC, vascular smooth muscle cells; COX-2, cyclooxygenase-2.

\* Corresponding author at: Department of Physiological Sciences, Federal University of Espírito Santo, Av. Marechal Campos, 1468, Maruípe, Vitória, Espírito Santo 29042-755, Brazil. Tel.: +55 27 33357329; fax: +55 27 33357330.

\*\* Corresponding author at: Department of Morphology/CCS, Federal University of Espírito Santo, Av. Marechal Campos, 1468, Maruípe, Vitória, Espírito Santo, 290440-090, Brazil. Tel.: +55 27 33357540; fax: +55 27 33357358.

E-mail addresses: [samyallimaro@hotmail.com](mailto:samyallimaro@hotmail.com) (S.M.L. Rodrigues), [jbgaceli@ccs.ufes.br](mailto:jbgaceli@ccs.ufes.br) (J.B. Graceli), [ivanitaufes@hotmail.com](mailto:ivanitaufes@hotmail.com) (I. Stefanon).

0378-4274/\$ – see front matter © 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.01.002>

### 1. Introduction

Organotin compounds (OTCs) such as tributyltin (TBT) and triphenyltin (TPT) have been widely used as biocides, agricultural fungicides, wood preservatives, and disinfecting agents in circulating industrial cooling waters, as well as in antifouling paints for marine vessels (Piper, 1973). The toxicity level of OTCs may be related to the concentration, exposure time, bioavailability, and sensitivity of the biota, as well as the persistence of OTCs in the environment (de Carvalho Oliveira and Santelli, 2010).

An increase in the toxicity of organotin compounds can be related to their insolubility in water, and their high lipophilicity is the main parameter leading to bioaccumulation in food webs



(Fent, 2004). OTCs, especially triorganotin, induce an endocrine syndrome in some species of gastropods, known as imposex. This syndrome is characterized by the superimposition of male genitalia in females, which alters their reproductive function (Smith, 1981). The mechanism of action remains unclear, but appears to be related to the direct inhibition of the aromatase enzyme of cytochrome P<sub>450</sub> that converts testosterone to estradiol (Snyder et al., 1999). In female rats, TBT has been shown to modulate estradiol, alters the estrous cycle, impedes the development of ovarian follicles, induces an imbalance of ovarian hormones and reduces the number of gonocytes and germ cells, thereby affecting sexual development (Grote et al., 2004). Its effects on other functions are not well understood. Furthermore, TPT decreases aromatase activity in ovary cells (Nakanishi et al., 2002).

Estrogen is a steroid hormone involved mainly in the control of female reproductive functions. Among other effects, estrogen can be cardioprotective, causing endothelium-dependent and-independent vasodilation of coronary arteries isolated (Crews and Khalil, 1999). Estrogen treatment also increases aortic stiffness and potentiates endothelial vasodilator function in the hindquarters (Tostes et al., 2003).

According to *in vitro* results, both the sarcoplasmic reticulum (SR) Ca<sup>2+</sup> ATPase and Ca<sup>2+</sup> uptake were inhibited significantly in rats treated with these stannous compounds, indicating a transport inhibition of cardiac SR Ca<sup>2+</sup> (Kodavanti et al., 1991). Based on the knowledge that estradiol can modulate the cardiovascular system through both endothelium-dependent and independent vasodilation, our hypothesis was that TBT can increase the vascular reactivity of isolated aortic rings of female rats.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

The following materials were used for the experiments: L-phenylephrine hydrochloride (PHE), ACh chloride (ACh), N<sup>o</sup>-Nitro-L-Arginine Methyl Ester Hydrochloride (L-NAME), tetraethylammonium (TEA) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA), tributyltin chloride (TBT, 96% Sigma, St. Louis, Mo., USA), sodium phenobarbital (Fontoverter, Brazil), and sodium nitroprusside (SNP) (Merck & Co., Inc., Rahway, NY, USA). These chemicals were dissolved in distilled water, except TBT, which was dissolved in 0.4% ethanol. Salts and reagents used were of analytical grade.

### 2.2. Experimental animals

Female Wistar rats (12 weeks old), were kept under controlled temperature between 23–25 °C with 12:12 h light/dark cycle. Rat chow and filtered tap water were provided *ad libitum*. All protocols were approved by the Local Ethics Committee of Animals (CEUA-UFES 020/2009). The rats were divided into two groups: Control (CONT, n = 8) were treated daily with vehicle (ethanol 0.4%), and TBT-treated rats were treated with TBT (TBT, 100 ng kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> diluted in 0.4% ethanol vehicle, n = 8) by gavage for 15 days. All the animals were anesthetized with sodium phenobarbital (35 mg/kg, ip) before the surgical procedures.

### 2.3. Hormonal measurement

Immediately prior to removing the thoracic aorta, blood samples were collected via puncture of the abdominal aorta to measure the circulating levels of sex hormones. The blood samples were immediately centrifuged at 825 × g at 4 °C for 10 min to obtain plasma, which was stored at -20 °C for future measurements of progesterone and estradiol by radioimmunoassay (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA).

### 2.4. Tissue preparation

Animals were perfused with sterile saline containing heparin (10 U/mL) via the left cardiac ventricle followed by infusion with PBS-formalin. The aorta was removed and manually dissected into rings (3–4 mm, n = 5 per group), fixed in PBS-formalin, pH 7.4, for 24–48 h at room temperature. After fixation, tissues were dehydrated in graded ethanol, cleared in xylol, and embedded in paraffin at 60 °C and further sectioned into 5 µm slices. Sections were stained with H&E to visualize the aortic vascular tunics (Barreira et al., 2009). Processing and microscopic analysis were performed at the LICCAR Lab, Federal University of Espírito Santo, Brazil.

### 2.5. Histomorphometry

Histomorphometry image analysis system was composed of a digital camera (Axio-Cam ERc 5S) coupled to a light microscope (Olympus AX70; Olympus, Center Valley, PA). High resolution images (2048 × 1536 pixels buffer) were captured with Carl Zeiss AxioVision Rel. 4.8. Photomicrographs were obtained using a 10× objective, and the thickness of aortic wall (which included all vascular tunics/field) and the aortic wall area were calculated with the area measure tool of AxioVision Rel. 4.8. The results represent the thickness and the area of aortic wall and are expressed as the mean ± SEM.

### 2.6. Collagen density surfaces

Mallory trichrome stained sections were used to obtain 15 photomicrographs from aortic tissue with a 20× objective lens. The areas were randomly chosen, and areas without all vascular tunics were carefully avoided. The random fields from each well are photographed under phase contrast and analyzed in Image J. The images were converted into high-contrast black and white images to visualize collagen fibers stained. The results represent the percentage of collagen in the total aortic wall surface and it is expressed as the mean ± SEM, as described by dos Santos et al. (2012).

### 2.7. Protein extraction and immunoblotting

The animals were sacrificed and the aortas were removed and manually dissected into rings (3–4 mm, n = 5 per group) as described previously by Florim et al. (2011). The tissues were homogenized in lysis buffer (250 mmol/L sucrose, 1 mmol/L EDTA, 20 mmol/L imidazole, pH 7.2, and the following protease inhibitors: 1 mmol/L 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride, 1 mmol/L benzamide, 10 mg/L leupeptin, 1 mg/L pepstatin A, 1 mg/L aprotinin, and 1 mg/L chymostatin). Homogenization was carried out at 0 °C using a Potter homogenizer. The homogenate was centrifuged at 1000 × g for 10 min. The supernatant was saved, the pellet was suspended in three volumes of lysis buffer, and the centrifugation was repeated. Both supernatants were mixed and centrifuged at 10,000 × g for 20 min. The supernatant was saved and the pellet was discarded. The protein concentration was determined using the Lowry assay (1951). Proteins were solubilized by heating at 100 °C for 1 min in sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 5% glycerol, 0.01% bromophenol blue, and 1.7% β-mercaptoethanol). Standard SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was carried out by loading equal quantities of protein per lane (20 µg) on to 10% SDS-polyacrylamide gel. Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Hercules, CA) in Tris-glycine transfer buffer. The membranes were blocked with 5% (bovine serum) albumin (BSA, Sigma-Aldrich) in a Tris-buffered saline 0.05% Tween 20 solution (TBS-T) for 1 h at 4 °C, washed once for 10 min in TBS-T and then incubated with a mouse monoclonal antibody raised against the C-terminal domain of α1-smooth muscle actin (α-SMA, diluted 1:500 in 3% BSA in TBS-T overnight at 4 °C) (Santa Cruz Biotechnology, INC) or a rabbit polyclonal antibody raised against a peptide mapping region near the C-terminus of rat β-actin (β-actin, diluted 1:1000 in 3% BSA in TBS-T overnight at 4 °C) (Santa Cruz Biotechnology, INC). After incubation with the primary antibody, the membranes were washed three times with TBS-T for 10 min each wash. The α-SMA protein was detected using a secondary anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate (diluted 1:1000 in 3% BSA in TBS-T for 1 h at 4 °C) (Sigma Immuno-Chemicals), whereas the β-actin antibody was detected using an anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate (diluted 1:4000 in 3% BSA in TBS-T for 1 h at 4 °C) (from Sigma Immuno Chemicals). The blots for α-SMA and their respective β-actin (used as internal control) were visualized by a color development reaction using nitroblue tetrazolium chloride (NBT) and 50 mg/mL of 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate p-toluidine salt (BCIP) (all from Life Technologies, Rockville, MD) for 5 min. The α-SMA and β-actin bands were analyzed by densitometry using Image J software. Relative expression was normalized by dividing the α-SMA value by the corresponding internal control values (β-actin).

### 2.8. Superoxide anion detection

To detect O<sub>2</sub><sup>-</sup> level in the thoracic aorta, cryosections (8 µm) of aorta in Tissue-Tek optimized cutting temperature (OCT) were allowed to thaw and incubated with O<sub>2</sub><sup>-</sup> sensitive fluorescent dyedihydroethidium (DHE) (2 µM) at 37 °C for 30 min in the dark. The images were obtained by confocal fluorescent microscope (Leica DM 2500). Fluorescence was detected at 585 nm. The signal intensity within the media layer was analyzed in the whole circumference of 3 sections the vessel by a blinded researcher.

### 2.9. Tissue bath studies

All the animals were anesthetized with sodium phenobarbital (35 mg/kg, ip) and killed by exsanguination. A section of the thoracic aorta was removed and placed in oxygenated Krebs-Henseleit bicarbonate buffer of the following composition: 131 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 18 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 11 mM glucose, and 0.01 mM EDTA. The buffer was kept at 36.5 °C and was gassed with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> to maintain the pH at 7.4. The aorta was cleaned

of fat and connective tissue and cut into 4–5 mm-long rings. Four to five rings were obtained from each aorta. Rings were mounted between parallel wires in tissue baths (5 mL volume). Rings were stretched to an optimal resting tension of 1 g. The resting tension was maintained at this value and no changes were observed after incubation with the drugs. The isometric tension was recorded using an isometric force displacement transducer (GRASS FT03, RI, USA) connected to a data acquisition system (MP100 Biopac Systems, Inc., USA) (Marín et al., 1988).

## 2.10. Experimental protocols

The aorta was divided into rings of 3 to 4 mm that were free of connective tissues. Two metal rods were passed through the lumen of the rings, and one was fixed to the wall of the chamber and the other connected vertically to the isometric force transducer. After 30–45 min of equilibration, each aortic ring was exposed twice to 75 mM potassium chloride (KCl) to determine its maximum contractility. Each ring was washed three times sequentially, re-equilibrated and allowed to relax to baseline. Thirty minutes later, the rings were contracted with 0.1  $\mu$ M PHE, and 10  $\mu$ M ACh was added to assess the integrity of the endothelium. A relaxation of 90% or more indicated the functional integrity of the endothelium. Each ring was washed sequentially, re-equilibrated and allowed to relax to baseline. After 30 min, cumulative concentration-response curves were generated for PHE (0.1 nM to 300  $\mu$ M). In other experiments, the PHE concentration-response curve was constructed in endothelium-denuded rings. The endothelium was removed by gently rubbing the intimal surface with a stainless steel rod. The effectiveness of endothelium removal was confirmed by the absence of the relaxation induced by 10  $\mu$ M ACh in aortas pre-contracted with PHE within each group. The same PHE concentration-response curve was performed in the presence of solution containing 100  $\mu$ M L-NAME (nitric oxide synthase (NOS) blocker), 2 mM TEA ( $K^+$  channel blocker) or 0.3 mM apocynin (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced (NADPH) inhibitor). The smooth muscle and endothelium viability was tested using SNP (0.01 nM to 0.3  $\mu$ M) and ACh (0.1 nM to 300  $\mu$ M).

## 2.11. Statistical analysis

The contractile responses are reported as a percentage of the maximum response to 75 mM KCl. The relaxation responses to ACh and SNP are reported as the percentage of relaxation of the maximum contractile response. For each concentration-response curve, the maximum effect (Emax) and the concentration of agonist that produced 50% of the maximal response (log EC50) were calculated using non-linear regression analysis (GraphPad Prism Software, USA). The efficiency of the agonists is reported as pD2 (–log EC50).

The data are reported as the mean  $\pm$  SEM. Comparisons between groups were performed using Student's *t* test (unpaired) and *p*  $\leq$  0.05 was considered to be

significant. To compare the effects of L-NAME, TEA and apocynin on contractile responses to PHE, the results were reported as differences in the area under the concentration-response curve (dAUC) to PHE in CONT and in experimental situations. dAUC was calculated from the individual curve plots (GraphPad Prism Software), and the difference was reported as a percentage of the dAUC of the corresponding CONT situation.

Histomorphometric analyses were reported as mean  $\pm$  SEM. The data were tested for normality using Kolmogorov Smirnov tests. Comparisons between groups were performed using Student's *t*-test (unpaired). The results were considered statistically significant at *p* < 0.05.

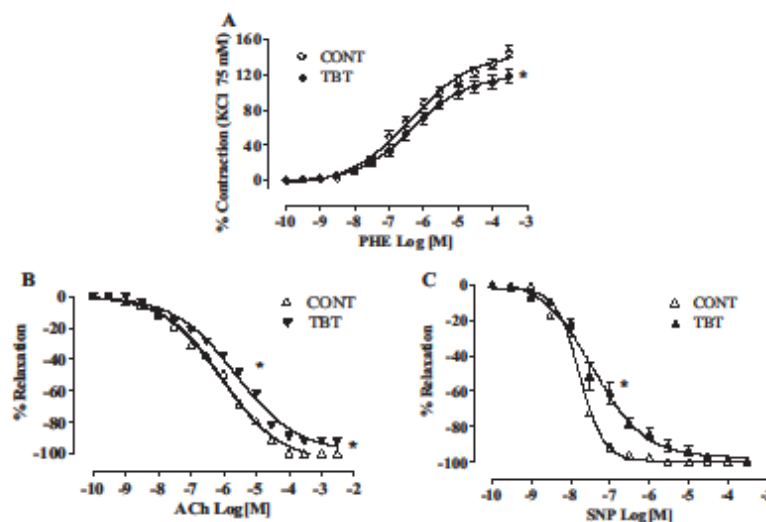
## 3. Results

### 3.1. Effects of tributyltin treatment on vasoconstrictor and relaxation response

Tributyltin treatment for 15 days did not affect the contractility response to KCl 75 mM. However, the contractility responses induced by PHE in the rat aorta (Fig. 1A) were reduced in the TBT group (Emax for CONT,  $n = 8 = 143.4 \pm 6.099$  vs. TBT,  $n = 9 = 119.1 \pm 8.501$ ,  $^*p < 0.05$ ). The ACh-induced relaxation (Fig. 1B) was reduced in the TBT group (pD2: CONT =  $-6.071 \pm 0.01$ ,  $n = 10$  vs. TBT =  $-5.629 \pm 0.022$ ,  $n = 10$ ; Emax: CONT =  $-105.3 \pm 0.1533$ ,  $n = 10$  vs. TBT =  $-99.17 \pm 1.099$ ,  $n = 10$ ,  $p < 0.05$ ). The Emax SNP-induced relaxation was unchanged in the TBT group compared to the CONT group, but the log EC50 was greater in the TBT-treated group (Fig. 1C) (pD2: CONT =  $-7.767 \pm 0.009$ ,  $n = 7$  vs. TBT =  $-7.433 \pm 0.1450$ ,  $n = 6$ ; Emax: CONT =  $-100.0 \pm 0.001$ ,  $n = 7$  vs. TBT =  $-99.15 \pm 0.408$ ,  $n = 6$ ,  $^*p < 0.05$  vs. CONT).

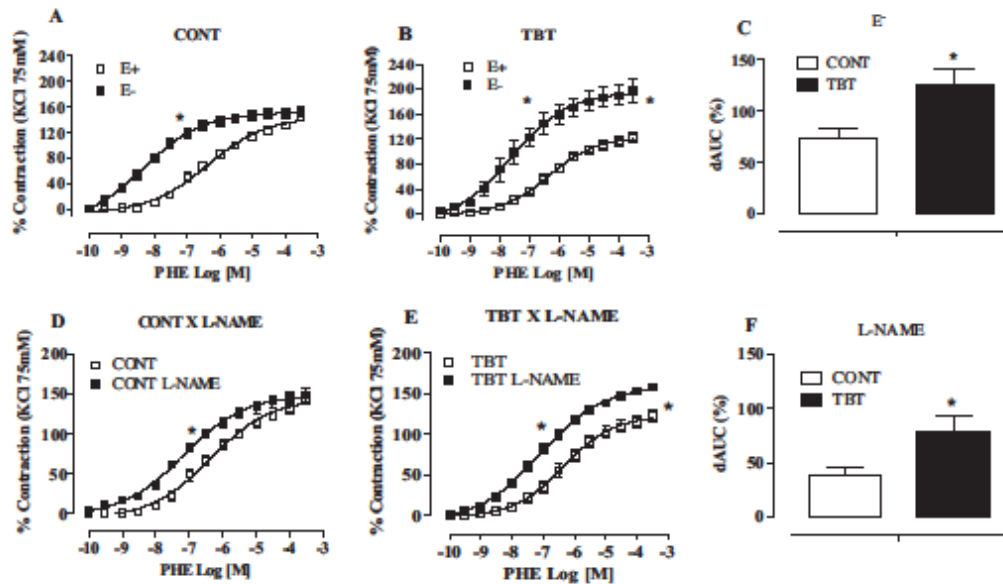
### 3.2. Investigation of endothelial participation

In the experiments performed without endothelium (Fig. 2A–C) and in the presence of NOS inhibitor L-NAME 100  $\mu$ M (Fig. 2D–F) the concentration-response curves were shifted to the left in response to PHE treatment in aortic segments from both



**Fig. 1.** (A) Concentration-response curves to PHE in isolated aortic rings from CONT ( $n = 8$ ) and TBT-treated ( $n = 8$ ) female Wistar rats. (B) Relaxation induced by ACh in isolated aortic rings of female Wistar rats from CONT ( $n = 8$ ), and TBT-treated ( $n = 8$ ) groups. The rings were pre-contracted with 75 mM KCl. (C) Relaxation induced by sodium nitroprusside in isolated aortic rings of female Wistar rats from CONT ( $n = 7$ ), and TBT-treated ( $n = 6$ ) groups. The rings were pre-contracted with 75 mM KCl. Symbols represent the mean  $\pm$  SEM. Unpaired *t* test,  $^*p < 0.05$ .





**Fig. 2.** (A) The effect of the endothelium removal (E<sup>-</sup>) on the concentration-response curve PHE in aortic rings from CONT (n=8) and (B) TBT-treated (n=8) female Wistar rats. (C) A comparison of the percentage difference of the area under the curve. (D) The effect of a NOS blocker (L-NAME) on the concentration-response curve PHE in rat aortic ring from CONT (n=8) and (E) TBT-treated (n=8) rats. (F) A comparison of the percent difference area under the curve. Symbols represent the mean  $\pm$  SEM. Unpaired *t* test. \**p* < 0.05.

groups. This response was not statistically different between TBT and CONT group (Emax CONT,  $n=10=152.6 \pm 8.273$  vs. TBT,  $n=7=194.7 \pm 17.98$  of contraction of KCl, *p* < 0.1670). Vascular reactivity increased in all groups incubated with the NOS inhibitor L-NAME 100  $\mu$ M. However, the magnitude of the L-NAME response was greater in the TBT group (Emax: CONT,  $n=9=139.9 \pm 12.15$  vs. TBT,  $n=9=150.9 \pm 6.853$  of KCl contraction, *p* < 0.05).

### 3.3. K<sup>+</sup> channels participation and the effect of antioxidant on the action of tributyltin in the contractile response to PHE in isolated aortic rings of rats

The vasoconstrictor response induced by PHE was potentiated in both groups in the presence of TEA (2 mM), a K<sup>+</sup> channel blocker (Fig. 3A–C). However, the dAUC was greater in preparations from tributyltin-treated animals than in the untreated group (dAUC CONT:  $n=7=27.35 \pm 6.25$  vs. TBT:  $n=7=72.9 \pm 14.1$  of KCl contraction, *p* < 0.05). To investigate the role of superoxide anions generated by NADPH oxidase activity on vascular reactivity to PHE in TBT-treated rats, the NADPH oxidase inhibitor, apocynin (0.3 mM) was used. Incubation with apocynin reduced reactivity to PHE in the TBT groups (Fig. 3D–F). These results suggest an increased release of superoxide anions generated by NADPH oxidase in the TBT group (dAUC: CONT:  $n=7=52.7 \pm 5.2$  vs. TBT:  $n=7=68.1 \pm 4.5$  of KCl contraction, *p* < 0.05).

### 3.4. Plasma levels of hormones; heart weights; and histological analysis

The rats treated with TBT displayed a significant decrease in serum 17 $\beta$ -estradiol levels compared with CONT rats (TBT:  $32.3 \pm 4.3$  pg/ml vs. CONT:  $47.2 \pm 7$  pg/ml, *p* < 0.05). In addition,

serum progesterone levels were increased in the TBT group compared with the CONT group (TBT:  $7.0 \pm 1.2$  ng/ml vs. CONT:  $4.0 \pm 0.7$  ng/ml, *p* < 0.05). The serum testosterone levels (Table 1) and body weight (data not shown) did not change after TBT. However, the TBT group exhibited an elevation in the LVW/BW ratio (CONT:  $0.020 \pm 0.01$  vs. TBT:  $0.026 \pm 0.07$  mg/g b.w., *p* < 0.05), but not in the RVW/BW ratio (CONT:  $0.055 \pm 0.004$  vs. TBT:  $0.066 \pm 0.004$  mg/g b.w.).

### 3.5. Histology analysis

The aortic rings exhibited signs of vascular atrophy 15 days after TBT-exposure. This was demonstrated in TBT-treated animals, where both the thickness and area of the aortic wall (Fig. 4A–C) were decreased compared with controls (CONT:  $0.46 \pm 0.06$  vs. TBT:  $0.19 \pm 0.04$   $\mu$ m; CONT:  $361.3 \pm 27.8$  vs. TBT:

**Table 1**  
Summary data of the changes in plasma concentration of female sexual hormones, food intake, body and heart weight in CONT and TBT-treated (100 ng/kg) female Wistar rats. Values are reported as the mean  $\pm$  SEM. Unpaired *t* test. \**p* < 0.05, 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) and progesterone (P<sub>4</sub>). Body weight (b.w.). Ratio of right or left ventricle weight (including the septum) and body weight (RVW/BW or LVW/BW, respectively).

Groups	CONT	TBT
E <sub>2</sub> , pg/ml	47.2 $\pm$ 7.0	32.3 $\pm$ 4.3*
Testosterone	4.8 $\pm$ 0.8	4.3 $\pm$ 0.2
P <sub>4</sub> , ng/ml	4.0 $\pm$ 0.7	7.0 $\pm$ 1.2*
Food intake, g/day	15.3 $\pm$ 1.1	16.8 $\pm$ 1.3
Initial, b.w., g	226.8 $\pm$ 5.4	225.3 $\pm$ 3.7
Final, b.w., g	236.3 $\pm$ 6.5	224.3 $\pm$ 4.1
RVW/BW, mg/g b.w.	0.055 $\pm$ 0.004	0.066 $\pm$ 0.004
LVW/BW, mg/g b.w.	0.020 $\pm$ 0.01	0.026 $\pm$ 0.07*

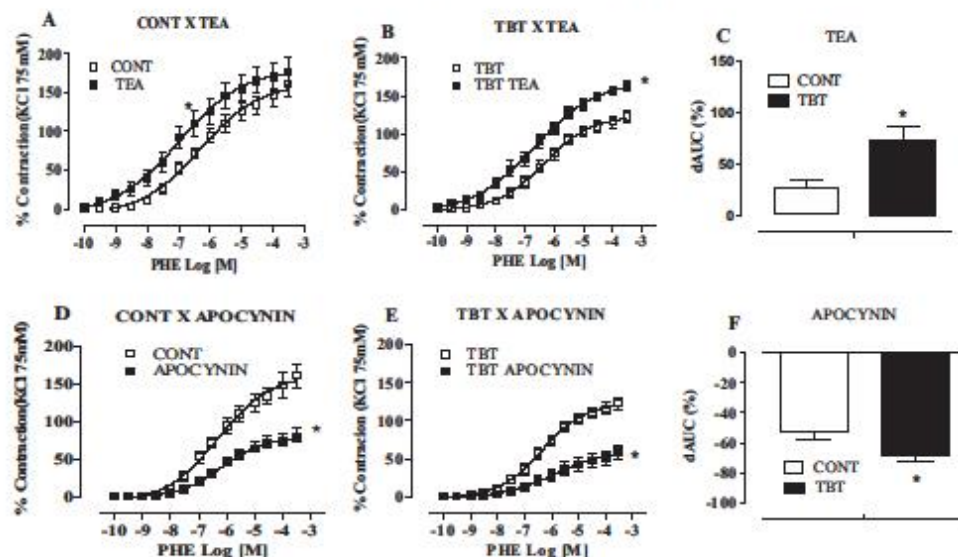


Fig. 3. (A) The effect of  $K^+$  channel blocking via TEA on the concentration-response curve to PHE in aortic rings from CONT ( $n=8$ ) and (B) TBT-treated ( $n=8$ ) female Wistar rats. (C) A comparison of the percentage difference of area under the curve. (D) The effect of inhibiting the production of free radicals by apocynin on the concentration-response curve PHE in rat aortic rings from CONT ( $n=8$ ), and (E) TBT-treated ( $n=8$ ) rats. (F) A comparison the percentage difference of area under the curve. Symbols represent the mean  $\pm$  SEM. Unpaired  $t$  test. \*  $p < 0.05$ .

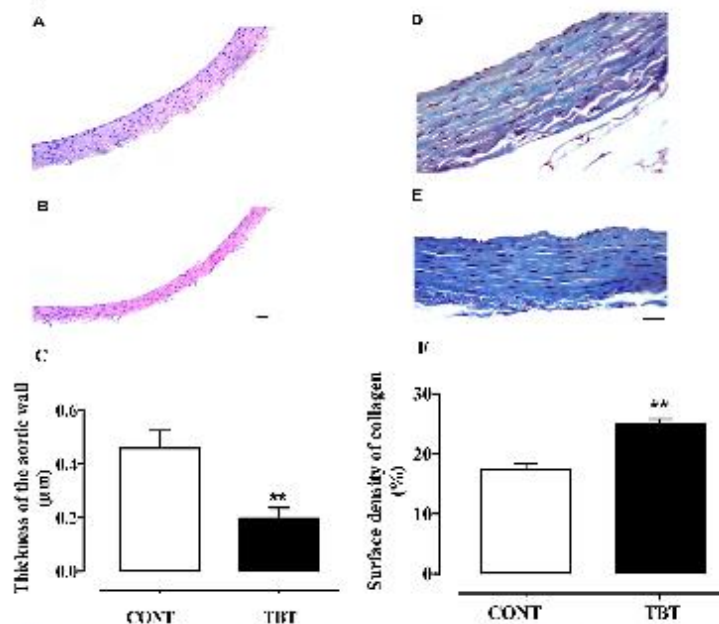


Fig. 4. Photomicrography of HE-stained aortic rings sections from CONT and TBT-treated (100 ng/kg) female Wistar rats treated for 15 days. (A) Aortic rings section from CONT rats showing normal morphology. (B) Aortic ring section from TBT-treated rats showing signs of vascular atrophy. (C) Graphic representation (means  $\pm$  SEM) of the aorta wall thickness in both experimental groups. \*  $p < 0.05$  vs. CONT. Bar = 20  $\mu m$ . Evaluation of collagen surface density of aortic rings between elastic membranes was carried out staining with Mallory trichrome. (D) Representative image CONT aortic ring. (E) Representative image of TBT-treated aortic ring. (F) Graphic representation (means  $\pm$  SEM) of collagen surface density with an increase in aortic wall surface area from the TBT-treated group. \*  $p < 0.05$  vs. CONT. Bar = 20  $\mu m$ .

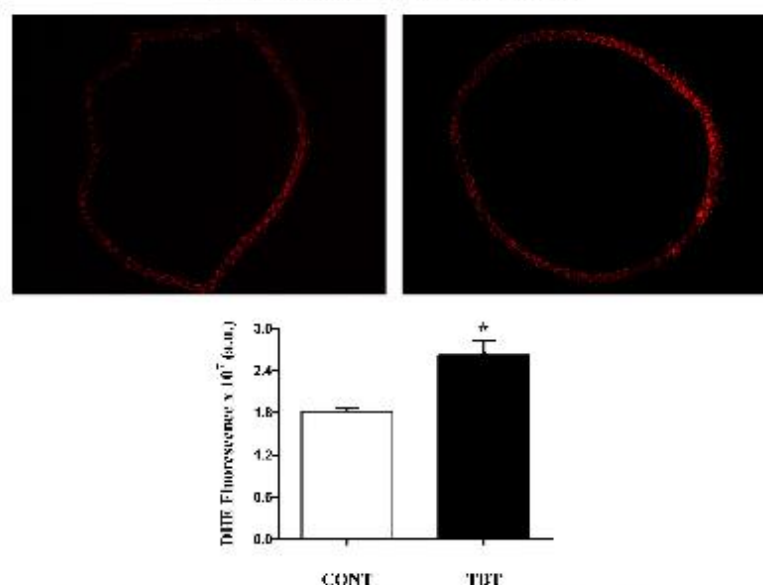


Fig. 5. In situ detection of superoxide anion. Fluorescence micrographs of aortic rings stained with the  $O_2^-$  sensitive dye DHE (red fluorescence) were obtained from CONT and TBT-treated for 15 days (100 ng/kg) female Wistar rats. Images were acquired at identical settings. \* $p < 0.01$ .

$241.8 \pm 11.2 \mu m^2 \times 10^{-3}$ ,  $p < 0.01$ ,  $n = 5$ , respectively). Collagen deposition was significantly higher in the TBT group (between elastic membranes), as demonstrated by Mallory trichrome staining (Fig. 4D–F) compared with the control (CONT:  $17.2 \pm 1.0$  vs. TBT:  $24.8 \pm 0.9\%$ ,  $n = 5$ ,  $p < 0.05$ ), indicating that TBT impairs the morphology of aortic vascular tissue.

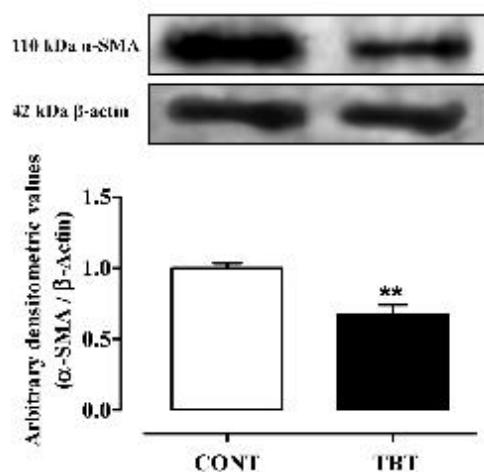


Fig. 6. Immunoblotting analysis for  $\alpha$ -SMA protein expression in aortic rings from CONT and TBT-treated for 15 days (100 ng/kg) female Wistar rats. The results are expressed as the means  $\pm$  SEM. \*\* $p < 0.05$ .

### 3.6. Superoxide anion detection

The  $O_2^-$  level in the thoracic aorta was detected using cryosections of aorta with  $O_2^-$  sensitive fluorescent dyedihydroethidium (DHE). The images obtained by confocal fluorescent microscope were represented in the Fig. 5. The signal intensity within the media layer was higher in the TBT group than in the CONT,  $p < 0.01$ .

### 3.7. Immunoblotting analysis

The  $\alpha$ -SMA protein expression was assessed in the aorta after TBT-exposure. In aortic rings, the expression of  $\alpha$ -SMA protein of TBT rats was lower ( $0.67 \pm 0.06$ ,  $n = 5$ ,  $p < 0.05$ ) compared to controls ( $1.00 \pm 0.03$ ,  $n = 5$ ,  $p < 0.05$ , Figure 6).

## 4. Discussion

The results presented here show that low doses of TBT decreased the vascular reactivity of female rats aortic rings to PHE by a mechanism involving an imbalance in the effects of some endothelial factors such as nitric oxide-NO,  $K^+$  channels and reactive oxygen species-ROS, the impairment of vascular smooth muscle relaxation to SNP and altered aortic ring morphology.

Usually, maximum toxicological activity is provided by triorganotin compounds, such as TBT. If the inorganic radical linked to the tin atom is itself a toxic compound, the biological activity of OTCs can be increased (Snoeijs et al., 1987). For TBT, Penninks (1993) proposed a tolerable daily intake (TDI) level for humans of  $0.25 \mu g/kg$  body weight based on immunotoxicity studies. This value was adopted by the World Health Organization (WHO), and a slightly higher value of  $0.3 \mu g/kg$  body weight was proposed by the U.S. Environmental Protection Agency (U. S. EPA, 1997). Investigations demonstrated that rats' exposure to triorganotin result in



distribution in brain, liver, kidneys, heart, blood and it can cross the placenta and accumulate in fetal tissues (Cook et al., 1984).

Toxicity of OTCs to vertebrate species has been a cause for concern as well. Studies in rodents have shown that TBT and TPT are absorbed in the gastro-intestinal tract and the levels of TPT and its metabolites in the liver and kidneys are higher than levels in the blood and other tissues. OTCs persist as prevalent contaminants in dietary sources, such as fish and shellfish, and through pesticide use on high-value food crops (Ohhira et al., 1999). Additional human exposure to OTCs may occur through their use as antifungal agents in wood treatments, industrial water systems, and textiles (Iguchi et al., 2007).

The role of TBT in the regulation of vascular tone remains incompletely understood. Solomon and Krishnamurthy (1992), demonstrated that TBT did not interfere with norepinephrine-induced contraction or SNP-induced vasorelaxation in aortic vessels. Yoshizuka et al. (1992) have described damage to the endothelial cells resulting in subendothelial edema. TBT also produced a dose-dependent inhibition of atrial natriuretic peptide-induced vasorelaxation (Solomon and Krishnamurthy, 1992). In the present study, we observed a reduction in the reactivity to PHE in aortic rings after 15 days of TBT exposure and changes in morphologic aspects of aortic rings. To investigate NO modulation, the NOS inhibitor, L-NAME, was used. We observed that L-NAME increased the sensibility and did not change the maximum response on the CONT group, but increased the maximum response and the sensibility to PHE in the TBT groups. These results suggest that the effect of TBT were dependent on the endothelium and NO.

Our data also suggest a TBT endothelium independent action. Considering a reduced SNP and ACh sensitivity response on the TBT group, we would speculate TBT may act on the smooth muscle besides endothelium. However, the PHE concentration-response curves from TBT and Control groups without endothelium were not different. It could be interpreted as a partial action of TBT on the smooth muscle excitation-contraction coupling, important in the relaxation process but not in the contraction process.

Triorganotin, like TBT, have pleiotropic adverse effects on both invertebrate and vertebrate endocrine systems (Grün et al., 2006). The exposure of female rats to TBT results in the development of reproductive abnormalities (Grote et al., 2004) and changes to serum estradiol levels (Nakanishi et al., 2002). Several investigations have demonstrated the cardioprotective properties of estrogens (Karas et al., 1999). In isolated rat aortas, E<sub>2</sub> has an endothelium-independent, non-genomic vasorelaxant effect (Castillo et al., 2006). Nevertheless, E<sub>2</sub> enhances constrictor prostanoid function in female rat aortas by upregulating the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and thromboxane synthase in both endothelium and vascular smooth muscle cells (VSMC) of the aorta, and by upregulating the expression of endoperoxide/thromboxane receptor in VSMC (Li et al., 2008). Despite the prevalence of vasoconstrictor prostanoids derived from COX-2 in aortas from ovariectomized rats, ACh-induced relaxation is maintained, most likely as consequence of the positive regulation that prostanoids exert on endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activity (Martorell et al., 2009).

In the present study, we observed a reduction in serum estrogen levels and an increase in P<sub>4</sub> levels after TBT treatment. In agreement with our results, P<sub>4</sub> induced the relaxation of KCl-induced contraction of rat aortic rings, in part due to an endothelial NO-dependent manner and caused a reduction of vascular tone, most likely due to blockade of voltage-dependent and/or receptor-operated calcium channels (Glusa et al., 1997).

Previous studies have shown that alterations in K<sup>+</sup> channel function are possibly involved in the modulation of vascular tone in different vascular beds (Yeung et al., 2007). However, changes in vascular reactivity after exposure to low concentrations of TBT

have not been previously described. In other physiologic functions, Tang et al. (2010) showed that trimethyltin chloride changes the renal K<sup>+</sup> balance, opening K<sup>+</sup> channels in renal intercalated cells of Sprague-Dawley rats, reducing urine K<sup>+</sup> reabsorption and inducing hypokalemia. In mouse N1E-115 neuroblastoma cells, none of the tested organotin compounds (TBT, Dibutyltin-DBT and Triphenyltin-TPT) altered the voltage-dependent K<sup>+</sup> current. However, in human lymphocytes, DBT affects both the peak amplitude and the time to peak of the K<sup>+</sup> current in a concentration-dependent manner. The increased NO bioavailability could open K<sup>+</sup> channels and contribute to increased negative modulation of the PHE contraction. We demonstrated that TEA, potentiated the response to PHE in aortic segments from both groups, but these effects were greater in preparations from TBT-treated rats, as demonstrated by dAUC values. Despite the changes in endothelial factors and vascular smooth muscle cell function, the vasodilatory effects of TEA were more significant and made a greater contribution to the reduction in the vascular reactivity to PHE. This result suggested that the NO could be activating the K<sup>+</sup> channels at VSMC (Bolotina et al., 1994).

The NADPH oxidase family plays a central role in generation of reactive oxygen species (ROS) in cardiovascular disorders. In rat thymocytes, Gennari et al. (2000) demonstrated that Di-n-butyltin dichloride (DBTC) and tri-n-butyltin chloride (TBT) cause oxidative stress and activation of caspases. We showed that apocynin (a specific NADPH oxidase inhibitor) reduced the PHE response in the aortic rings from both groups, but these effects were greater in the aortic segments from TBT-treated female rats, as shown by the dAUC. Apocynin treatment promoted a greater decrease in the vasoconstrictor response to PHE in the aortic rings of TBT treated rats than in CONT rats. The O<sub>2</sub><sup>-</sup> level in the thoracic aorta was higher in the TBT group than in the CONT. This finding suggested that TBT exposure led to increased NADPH activity, suggesting that the oxidative stress induced by the enzyme could reduce NO bioavailability.

Moreover, E<sub>2</sub> deficiency in cultured mouse vascular smooth muscle cells was associated with an increase in vascular superoxide release and NADPH oxidase activity. E<sub>2</sub> replacement prevented this increase, whereas P<sub>4</sub> substitution enhanced ROS production and NADPH oxidase activity (Wassmann et al., 2005).

The aorta is a capacitance vessel that enables the transformation of the on/off blood-flow characteristics of the left ventricle into a smooth no pulsatile blood-flow pattern in more distal vessels (Safar et al., 1998). Furthermore, large arteries are no longer considered passive conduits, but rather in terms of their active behavioral response to the mechanical forces to which they are subjected.

This notion is supported by the fact that cardiovascular diseases are accompanied by vascular changes that include hypertrophy and an increase in the diameter of large arteries, in addition to the concept that the damage to the large arteries is a major factor in cardiovascular morbidity and mortality. In agreement with these data, the intimal-medial ratio has emerged as an index of cardiovascular disease and is generally regarded as a biomarker of atherosclerosis (Guo et al., 2006). The present study found a reduction in both the thickness and area of the aortic wall in the treated group. These data suggest that the exposure to TBT during 15 days may have induced changes in the aortic morphology associated with impairment in aortic reactivity, usually observed in chronic process such as aging hypertension, diabetes mellitus and end-stage renal disease. It has been previously demonstrated that abnormal collagen deposition in the aortic arterial wall contributes to increased arterial stiffness (Stevens et al., 1976) and in spontaneously hypertensive rats (SHR) (Marque et al., 2002). This impairment of aortic morphology may be associated with a decrease in the vascular reactivity in our study, and demonstrates that this xenobiotic could be directly connected to a failure in one or more vascular mechanisms as shown

by the increase in collagen deposition along the aortic wall after TBT exposure.

Cardiovascular disorders such as hypertension activate vascular smooth muscle cells (VSMCs), which are essential contributors to vascular remodeling (Hayashi and Naiki, 2009). Activated VSMCs regain their proliferative and migratory capacities, secrete matrix proteins, and down regulate smooth muscle contractile proteins, such as  $\alpha$ -SMA, smooth muscle 22 $\alpha$  (SM22 $\alpha$ ), smooth muscle myosin heavy chain, and calponin (Owens et al., 2004), as observed in SHR (Zhang et al., 2010). Our results corroborate these studies, demonstrating that oral exposure to TBT results in a decrease in  $\alpha$ -SMA protein expression in aortic rings. In summary, these findings suggest that a reduction in the reactivity to PHE in aortic rings may be explained by its morphofunctional changes and likely due to mechanisms dependent on NO bioavailability, K<sup>+</sup> channels and an increase in the vascular oxidative stress after TBT treatment.

Notes

#### Conflict of interest

The authors declare no competing financial interest.

#### Acknowledgement

This study was financial supported by Brazilian Government Federal and State Institutes: CAPES, FAPES and CNPq.

#### References

- Barreira, A.L., Takiya, C.M., Castiglione, R.C., Maron-gutierrez, T., Barbosa, C.M., Ornelas, D.S., Verdoom, K.S., Pascarelli, B.M., Elnicker-lamas, M., Leite Jr., M., Morales, M.M., Viegas, A., 2009. Bone marrow mononuclear cells attenuate interstitial fibrosis and stimulate the repair of tubular epithelial cells after unilateral ureteral obstruction. *Cell Physiol. Biochem.* 24, 585–594.
- Bolotina, V.M., Najibi, S., Palacino, J.J., Fagan, P.J., Cohen, R.A., 1994. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 368, 850–853.
- Castillo, C., Ceballos, G., Rodríguez, D., Villanueva, C., Medina, R., López, J., Méndez, E., Castillo, E.F., 2006. Effects of estradiol on PHE contractility associated with intracellular calcium release in rat aorta. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 291, C1388–C1394.
- Cook, L.L., Stine, K.E., Reiter, L.W., 1984. Tin distribution in adult rat tissues after exposure to trimethyltin and triethyltin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 76, 344–348.
- Crewe, J.K., Khalil, R.A., 1990. Antagonistic effects of 17 $\beta$ -Estradiol, progesterone, and testosterone on Ca<sup>2+</sup> entry mechanisms of coronary vasoconstriction. *J. Am. Heart Assoc.* 19, 1034–1040.
- de Carvalho Oliveira, R., Santelli, R.E., 2010. Occurrence and chemical speciation analysis of organotin compounds in the environment: a review. *Talanta* 82, 9–24.
- dos Santos, R.L., Podratz, P.L., Sena, G.C., Filho, V.S., Lopes, P.F., Gonçalves, W.L., Alves, L.M., Samoto, V.Y., Takiya, C.M., de Castro Miguel, E., Moysés, M.R., Graceli, J.B., 2012. Tributyltin impairs the coronary vasodilation induced by 17 $\beta$ -estradiol in isolated rat heart. *J. Toxicol. Environ. Health A* 75, 948–959.
- United States Environmental Protection Agency, 1997. Tributyltin oxide. In: *Toxicological review*. Environmental Protection Agency, <http://www.epa.gov/iris/toxreviews/0349tr.pdf>. (accessed 22.05.13).
- Fent, K., 2004. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicology* 205, 223–240.
- Florim, J., Ribeiro Júnior, R.F., Silveira, E.A., Padilha, A.S., Vescovi, M.V., de Jesus, H.C., Stefann, I., Salzaes, M., Vassallo, D.V., 2011. Low-level lead exposure increases systolic arterial pressure and endothelium-derived vasodilator factors in rat aortas. *PLoS One* 6, e17117.
- Gennari, A., Viviani, B., Galli, C.L., Marinovich, M., Pieters, R., Corsini, E., 2000. Organotin compounds induce apoptosis by disturbance of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and mitochondrial activity, causing oxidative stress and activation of caspases in rat thymocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 169, 185–190.
- Glusa, E., Griser, T., Wagner, S., Oettel, M., 1997. Mechanisms of relaxation of rat aorta in response to progesterone and synthetic progestins. *Maturitas* 28, 181–191.
- Grote, K., Stahlschmidt, B., Talsness, C.E., Gericke, C., Appel, K.E., Chahoud, I., 2004. Effects of organotin compounds on pubertal male rats. *Toxicology* 202, 145–158.
- Grin, F., Watanabe, H., Zamanian, Z., Maeda, L., Arima, K., Cubacha, R., Gardiner, D.M., Kanno, J., Iguchi, T., Blumberg, B., 2006. Endocrine disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. *Mol. Endocrinol. (Baltimore Md.)* 20, 2141–2155.
- Guo, X., Oldham, M.J., Kleinman, M.T., Phalen, R.F., Kassab, G.S., 2006. Effect of cigarette smoking on nitric oxide, structural, and mechanical properties of mouse arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 291, H2354–H2361.
- Hayashi, K., Naiki, T., 2009. Adaptation and remodeling of vascular wall: biomechanical response to hypertension. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2, 3–19.
- Iguchi, T., Watanabe, H., Katsa, Y., 2007. Toxicogenomics and ecotoxicogenomics studying endocrine disruption and basic biology. *Gen. Comp. Endocrinol.* 153, 25–29.
- Karas, R.H., Hodgins, J.B., Kwoun, M., Krege, J.H., Aronovitz, M., Mackey, W., Gustafson, J.A., Korach, K.S., Smithies, O., Mendelsohn, M.E., 1990. Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor b-deficient female mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 15133–15136.
- Kodavanti, P.R., Cameron, J.A., Yallapragada, P.R., Vij, P.J., Desai, D., 1991. Inhibition of Ca<sup>2+</sup> transport associated with cAMP-dependent protein phosphorylation in rat cardiac sarcoplasmic reticulum by triorganotin. *Arch. Toxicol.* 65, 311–317.
- Li, M., Kuo, L., Stallone, J.N., 2008. Estrogen potentiates constrictor prostanoid function in female rat aorta by upregulation of cyclooxygenase-2 and thromboxane pathway expression. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294, H2444–H2455.
- Marin, J., Sanchez-terrer, C.F., Salzaes, M., 1988. Effects of ouabain on isolated cerebral and femoral arteries of the cat: a functional and biochemical study. *Br. J. Pharmacol.* 93 (1), 43–52.
- Marque, V., Grima, M., Kieffer, P., Capdeville-Atkinson, C., Atkinson, J., Lartaud-idouadiene, L., 2002. Withdrawal reveals lack of effect of prolonged antihypertensive treatment on intrinsic aortic wall stiffness in senescent spontaneously hypertensive rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 29, 898–904.
- Martorell, A., Sagredo, A., Aras-López, R., Balfagón, G., Ferrer, M., 2009. Ovarianectomy increases the formation of prostanoids and modulates their role in ACh-induced relaxation and nitric oxide release in the rat aorta. *Cardiovasc. Res.* 84, 300–308.
- Nakanishi, T., Kohroki, J., Suzuki, S., Ishizaki, J., Hirotsu, Y., Takasuga, S., Itoh, N., Watanabe, Y., Utoguchi, N., Tanaka, K., 2002. Tributyltin compounds enhance human CG secretion and aromatase activity in human placental Choriocarcinoma Cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 2830–2837.
- Ohira, S., Matsui, H., Watanabe, K., 1990. Effects of pretreatment with cytochrome P-450 inducers, especially phenobarbital on triphenyltin metabolism and toxicity in hamsters. *Toxicology* 137, 151–159.
- Owens, G.K., Kumar, M.S., Wamhoff, B.R., 2004. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol. Rev.* 84, 767–801.
- Penninks, A.H., 1993. The evaluation of data-derived safety factors for bis(tri-n-butyltin) oxide. *Food Addit. Contam.* 10, 351–361.
- Phiver, W.T., 1973. Organotin compounds: industrial applications and biological investigation. *Environ. Health Perspect.* 4, 61–79.
- Safar, M.E., London, G.M., Asmar, R., Frohlich, E.D., 1998. Recent advances on large arteries in hypertension. *Hypertension* 32, 156–161.
- Smith, B.S., 1981. Tributyltin compounds induce male characteristics on female mud snails *Nassarius obsoletus*—*Ilyanassa obsoleta*. *J. Appl. Toxicol.* 1, 141–144.
- Snoei, N.J., Penninks, A.H., Seinen, W., 1987. Biological activity of organotin compounds: an overview. *Environ. Res.* 44, 335–353.
- Snyder, S.A., Snyder, E., Villeneuve, D., Kurunthachalam, K., Villalobos, A., Blankenship, A., Giesy, J., 1999. Instrumental and bioanalytical measures of endocrine disruptors in water. In: Keith, L.H., Jones-Lepp, T.J., Needham, L.L. (Eds.), *Analysis of Environmental Endocrine Disruptors*, ACS Symposium Series 747, vol. 6. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 73–95.
- Solomon, R., Krishnamurthy, V., 1992. The effect of tributyltin chloride on vascular responses to atrial natriuretic peptide. *Toxicology* 76, 39–47.
- Stevens, R.L., Colombo, M., Gonzales, J.J., Hollander, W., Schmid, K., 1976. Os glucosaminoglicos da artéria humano e suas mudanças na aterosclerose. *J. Clin. Invest.* 58, 470–481.
- Tang, X., Yang, X., Lai, G., Guo, J., Xia, L., Wu, B., Xie, Y., Huang, M., Chen, J., Ruan, X., Sul, G., Ge, Y., Zuo, W., Zhao, N., Zhu, G., Zhang, J., Li, L., Zhou, W., 2010. Mechanism underlying hypokalemia induced by trimethyltin chloride: Inhibition of H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in renal intercalated cells. *Toxicology* 271, 45–50.
- Tostes, R.C., Nigro, D., Fortes, Z.B., Carvalho, M.H.C., 2003. Effects of estrogen on the vascular system. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36, 1143–1158.
- Wassmann, K., Wassmann, S., Nickenig, G., 2005. Progesterone antagonizes the vasoprotective effect of estrogen on antioxidant enzyme expression and function. *Circ. Res.* 97, 1046–1054.
- Yeung, S.Y.M., Pucovsky, V., Mollatt, J.D., Saldanha, L., Schwake, M., Ohya, S., Greenwood, L., 2007. Molecular expression and pharmacological identification of a role for Kv7 channels in murine vascular reactivity. *Br. J. Pharmacol.* 151, 758–770.
- Yoshizuka, M., Hara, K., Doi, Y., Mori, N., Yokoyama, M., Ono, E., Fujimoto, S., 1992. The toxic effects of bis (tributyltin) oxide on the rat thoracic aorta. *Histol. Histopathol.* 7, 445–449.
- Zhang, Xie, L., Wang, P., Yang, J., Fang, Q., Zhou, C., Li, S.J., 2010. *J. Biol. Chem.* 285, 13666–13677.